



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

BRUNA BANDEIRA PINHEIRO

**QUITOSANA ATIVADA COM DIVINILSSULFONA COMO UM NOVO SUPORTE
PARA IMOBILIZAR E ESTABILIZAR ENZIMAS**

FORTALEZA

2017

BRUNA BANDEIRA PINHEIRO

**QUITOSANA ATIVADA COM DIVINILSSULFONA COMO UM NOVO SUPORTE
PARA IMOBILIZAR E ESTABILIZAR ENZIMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia. Área de concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pinheiro, Bruna Bandeira.

Quitosana ativada com divinilssulfona como um novo suporte para imobilizar e estabilizar enzimas /
Bruna Bandeira Pinheiro. – 2017.
53 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
Coorientação: Prof. Dr. José Cleiton Susa dos Santos.

1. Divinilssulfona. 2. Quitosana. 3. Lipase B de Candida antarctica. 4. Imobilização. 5. Ligação
multipontual. I. Título.

CDD 660

BRUNA BANDEIRA PINHEIRO

**QUITOSANA ATIVADA COM DIVINILSSULFONA COMO UM NOVO SUPORTE
PARA IMOBILIZAR E ESTABILIZAR ENZIMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 20/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (Unilab)

Prof. Dr. Marcos Carlos Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.
Aos meus amados pais,
Tarcília e Carlos.
Ao meu irmão André.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por todas as oportunidades que encontrei até aqui e por sempre guiar meus passos.

Agradeço aos meus pais por todo carinho, apoio, confiança e dedicação ao longo dessa caminhada. Agradeço ao meu irmão por todo apoio e por ser um exemplo e inspiração para mim.

Agradeço a minha avó Adalgisa pelo compartilhamento de experiências vividas. Agradeço ao meu namorado Lucas, por todo apoio e compreensão.

À minha orientadora Profa. Luciana, meu agradecimento pela confiança que sempre depositou em mim, pelas oportunidades, pelo carinho, amizade e comprometimento ao longo desses anos de orientação.

Ao meu co-orientador Prof. Cleiton, agradeço pela disponibilidade, atenção e dedicação em minha orientação.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio e confiança depositada ao longo dessa jornada. Agradeço a Eli e a Toinha por todo cuidado e dedicação. Agradeço, também, a minha tia de coração, Graça, por sempre rezar por mim, me dar bons conselhos e me ajudar nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de colégio por sempre estarem presentes na minha vida e vibrarem com minhas vitórias. Aos meus amigos do laboratório em especial, a Nathalia, Kímerle, Maísa, Rayanne, Fátima e Magno pelo apoio. A todos os membros do grupo GPBio pelo companheirismo, apoio, risadas e momentos únicos.

Agradeço ao Prof. Enrique de Málaga pelas análises de caracterização do suporte.

Ao seu Luís, ao Jorjão e a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação acadêmica.

“Se fracassar, ao menos que fracasse ousando grandes feitos, de modo que a sua postura não seja nunca a dessas almas frias e tímidas que não conhecem nem a vitória nem a derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Um novo suporte heterofuncional, a quitosana-divinilssulfona, é proposto neste estudo. O uso de quitosana como suporte para imobilização de enzimas é muito promissor, pois possui características que o tornam ideal para esta função, como boa resistência mecânica e química, além de ser um polímero biodegradável, renovável e de baixo custo. A divinilssulfona (DVS) foi escolhida como agente ativante, pois além de se ligar aos grupos hidroxila e amino da quitosana podem interagir com diferentes grupos das enzimas, como: amino, fenol, imidazol ou tiol. O suporte foi preparado introduzindo 7,5 mL de divinilssulfona (DVS) a 10 g de quitosana em três diferentes pHs (10, 12,5 e 14) de tampão de carbonato de sódio 333 mM. A enzima escolhida foi a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) porque tem alta estabilidade e enantiosseletividade, sendo capaz de atuar em várias reações de interesse industrial. Neste contexto, foi conduzido o estudo de ativação do suporte quitosana com divinilssulfona (DVS) para imobilizar a CALB. Os melhores resultados de imobilização foram para ativação de quitosana com divinilssulfona (DVS) a pH 12.5. Nestas condições, obteve-se 2.87 ± 0.06 U/g de atividade do derivado, 79.37% de rendimento de imobilização e quase 50% de atividade recuperada. No entanto, os melhores resultados para a inativação térmica foram para as enzimas imobilizadas em quitosana ativada a pH 10, onde os dois melhores biocatalisadores não atingiram o tempo de meia-vida após 24 e 48 horas, assim foram mais de 480 vezes e 960 vezes mais estáveis do que a enzima livre, respectivamente. Finalmente, alguns derivados foram aplicados em reação modelo de hidrólise do hexanoato de etila a pH 5, 7 e 9,2 obtendo a melhor atividade a pH 5. Os resultados mostraram que o suporte ativado com divinilssulfona é muito promissor e melhorou a estabilidade da enzima.

Palavras-chave: Divinilssulfona. Quitosana. Lipase B de *Candida antarctica*.

ABSTRACT

A new heterofunctional support, chitosan-divinylsulfone, is proposed in this study. The use of chitosan as a support for immobilization of enzymes is very promising since it has characteristics that make it ideal for this function as good mechanical and chemical resistance besides be a biodegradable polymer, renewable and low cost. The divinylsulfone (DVS) has been chosen as an activated agent because can interact with hydroxyl and amino groups of chitosan, in addition can interact with different groups of enzymes, such as: amino, phenol, imidazole or thiol. The support were prepared introducing 7.5 mL of divinylsulfone (DVS) at 10g of chitosan at three different pHs (10, 12.5 and 14) of sodium carbonate buffer. The enzyme choosed was Lipase B from *Candida antarctica* (CALB) because has high stability and enantioselectivity being able to act in various reactions of industrial interest. In this context, the study of activation support chitosan with divinylsulfone (DVS) was conducted in order to immobilize CALB. The best results of immobilization were at pH 12.5 of activation conditions of chitosan with divinylsulfone (DVS). Under these conditions, it was obtained 2.87 ± 0.06 U/g of derivative activity, 79.37 % of immobilization yield and almost 50 % of recovery activity. However, the bests results for inactivating thermal was for immobilized enzymes on chitosan activated at pH 10, where the best results did not reach the half-life after 24 and 48 hours, been more than 480 times and 960 times more stable than the free enzyme, respectively. Finally some derivatives were applied in model reaction of hydrolysis reaction of the ethyl hexanoate at pH 5, 7 and 9.2 getting the best activity at pH 5. The results show that the support activated with divinylsulfone is very promising and improved the enzyme stability.

Keywords: Divinylsulfone. Chitosan. Lipase B from *Candida antarctica*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sítio ativo (vermelho); resíduos de cisteína (amarelo); resíduos tirosina (preto); resíduos de lisina (verde). A estrutura foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando pymol vs educacional. O código PDB para CALB é 1TCA..... 21
- Figura 2 - Mecanismo de ativação da quitosana com divinilssulfona (DVS) sob pH alcalino, seguida da formação do complexo quitosana-vinilsulfona. O mecanismo também exhibe as possibilidades de ligações cruzadas ativadas com grupos presentes na superfície do próprio suporte..... 27
- Figura 3 - Padrões XDR das amostras de quitosana. (A) quitosana pura; (B) quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10; (C) quitosana ativado com divinilssulfona a pH 12.5; (D) Quitosana ativado com divinilssulfona a pH 14..... 34
- Figura 4 - Sítio ativo (vermelho); resíduos de cisteína (amarelo); resíduos tirosina (preto); resíduos de lisina (verde). A estrutura foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando pymol vs educacional. O código PDB para CALB é 1TCA..... 35
- Figura 5 - Eletroforese da lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: extrato enzimático; Poço 3: 10A; Poço 4: 10B; Poço 5: 10C; Poço 6: 10D; Poço 7: D10E; Poço 8: 10F; Poço 9: 10G; : Poço 10: 10H..... 40
- Figura 6 - Eletroforese da lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana ativada com divinilssulfona a pH 12.5. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: extrato enzimático; Poço 3: 12.5A; Poço 4: 12.5B; Poço 5: 12.5C; Poço 6: 12.5D; Poço 7: D12.5E; Poço 8: 12.5F; Poço 9: 12.5G; Poço 10: 12.5H..... 41

- Figura 7 - Eletroforese da lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana ativada com divinilssulfona a pH 14. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: extrato enzimático; Poço 3: 14A; Poço 4: 14B; Poço 5: 14C; Poço 6: 14D; Poço 7: D14E; Poço 8: 14F; Poço 9: 14G; Poço10: 14H..... 41
- Figura 8 - (A) Representação esquemática da ligação enzima-suporte através do resíduo da cisteína a pHs 5, 7 e 10. (B) Representação esquemática da ligação enzima-suporte através do resíduo da lisina a pH 10. Sítio ativo (vermelho); Resíduos de cisteína (amarelo); Resíduos tirosina (preto); Resíduos de lisina (verde). X pode ser os grupos amino, fenol, imidazol ou tiol das proteínas..... 43
- Figura 9 - Dados de estabilidade operacional do biocatalisador 10 C na catálise da reação de hidrólise do hexanoato de etila (A_{THE}) pH 5. Condições da reação: 30 min e 25 °C..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos utilizados para ativar o suporte quitosana na literatura.....	25
Tabela 2 - Análise elementar (carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre) de quitosana pura, quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10, 12.5 e 14. Outras especificações foram descritas nos métodos.....	36
Tabela 3 - Inativação térmica dos biocatalisadores a 60 °C. Os tempos de meia vida são expressos em minutos. Outras especificação foram descritas em métodos.....	38
Tabela 4 - Resultados do rendimento de imobilização (%), atividade da enzima imobilizada (U/g) antes (Atd 1) e depois (Atd 2) da incubação em tampão de carbonato de sódio 100 mM, pH 10, e bloqueio com EDA por 24 horas a 4 °C. Imobilização foi conduzida em tampão de acetato de sódio pH 5, tampão fosfato de sódio pH 7 e tampão carbonato de sódio pH 10. Outras especificações são descritas nos métodos.....	42
Tabela 5 - Atividade de diferentes preparações de derivados em relação a diferentes substratos sob diferentes condições. EH, hexanoato de etila. A actividade é dada em U por mg de enzima imobilizada.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CALB	Lipase comercial do tipo B de <i>Candida antarctica</i>
DVS	Divinilssulfona
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
DRX	Difração de Raio-X
<i>p</i> NPB	butirato de <i>p</i> -nitrofenila
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Enzimas	19
3.1.1	<i>Lipases</i>	19
3.1.2	<i>Lipase tipo B de Candida antarctica</i>	20
3.2	Imobilização de Enzimas	21
3.3	Quitosana	23
3.3.1	Grupos ativantes	23
3.3.1.1	<i>Ativação com glioxila</i>	23
3.3.1.2	<i>Ativação com glutaraldeído</i>	24
3.3.1.3	<i>Ativação com epóxido</i>	24
3.3.1.4	<i>Ativação com divinilssulfona</i>	25
3.3.2	<i>Ativação do suporte quitosana com divinilssulfona</i>	26
3.4	Hidrólise do hexanoato de etila	28
3.5	Ligação covalente	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Materiais	29
4.2	Métodos	29
4.2.1	<i>Preparação da quitosana</i>	29
4.2.2	<i>Ativação do suporte</i>	29
4.2.3	<i>Caracterização dos suportes produzidos</i>	29
4.2.4	<i>Imobilização da CALB em DVS-Quitosana</i>	30
4.2.5	<i>Determinação da atividade enzimática e da concentração de proteína</i>	30
4.2.6	<i>Parâmetros de imobilização</i>	31
4.2.7	<i>Estabilidade Térmica a 60°C</i>	32
4.2.8	<i>Análise qualitativa de proteínas SDS-PAGE</i>	32
4.2.9	<i>Efeito do pH na imobilização</i>	32
4.3	Hidrólise do hexanoato de etila	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1	Caracterização do suporte quitosana ativado com divinilssulfona	34

5.1.1	<i>Difração de Raio-X (DRX)</i>	34
5.1.2	<i>Espectroscopia de ATR-FTIR</i>	35
5.1.3	<i>Análise Elementar</i>	36
5.2	Parâmetros de Imobilização e Inativação Térmica	37
5.3	Análises qualitativa de proteína SDS-PAGE	40
5.4	Efeito do pH na imobilização	42
5.5	Hidrólise do hexanoato de etila	44
6	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas comumente usadas em catálise ((JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; EGGERT, 2002; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), devido à sua excelente atividade, especificidade, seletividade e robustez em uma variedade de sistemas reativos (ADLERCREUTZ, 2013; FAN; QIAN, 2010). A lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) tem um uso altamente diversificado devido à sua elevada enantiosseletividade, elevada estabilidade e capacidade de desempenho em vários substratos (RABBANI *et al.*, 2015), além de possuir uma pequena tampa que não isola completamente o sítio ativo do meio de reação (GOTOR-FERNÁNDEZ; BUSTO; GOTOR, 2006). No entanto, o uso de lipases como catalisadores industriais, precisam de estratégias a fim de facilitar sua reutilização (ADLERCREUTZ, 2013; DICOSIMO *et al.*, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013b).

Assim, uma estratégia utilizada para facilitar a recuperação do meio reacional enzimático é a imobilização. Esta resolve o problema de solubilização da proteína no meio reacional, contribuindo, assim, para uma purificação adicional dos produtos (ADLERCREUTZ, 2013; DICOSIMO *et al.*, 2013; LIESE; HILTERHAUS, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013b), além de permitir a sua aplicação industrial (GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYŃSKA, 2014; IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; MATEO *et al.*, 2007; PETKAR *et al.*, 2006).

A busca por novas estratégias de imobilização envolve a melhoria das propriedades catalíticas das enzimas, seletividade, estabilidade e especificidade (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Neste contexto, podem ser utilizadas várias estratégias para a imobilização de enzimas, como por exemplo: a ligação covalente multipontual entre a enzima e o suporte. A ligação covalente multipontual permite uma rigidez enzimática (MATEO *et al.*, 2007) e é uma das ferramentas mais poderosas para melhorar a estabilidade das proteínas (BRADY; JORDAAN, 2009; KLIBANOV, 1979; SINGH *et al.*, 2013). Desta forma, há um grande interesse por grupos que permitem obter ligações multipontuais, como a divinilssulfona (DVS).

Os grupos DVS podem interagir com diferentes porções da proteína (CESAR MATEO, OLGA ABIAN, GLORIA FERNÁNDEZ-LORENTE, JUSTO PEDROCHE, ROBERTO FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2002; MATEO *et al.*, 2007) produzindo uma certa rigidez. Esses grupos têm estabilidade em uma ampla faixa de valores de pH (4 a 10) (DOS SANTOS *et al.*, 2015) e devido à sua natureza hidrofóbica, a sua estabilização é mais elevada em alguns casos do que para outros grupos, tais como glioxil (HILTERHAUS *et al.*, 2008) e glutaraldeído (SANTOS

et al., 2015d). Além disso, a incubação em pH alcalino pode aumentar o número de interações enzima/suporte-ativado, contribuindo para a alta rigidez da enzima e para evitar alterações na distorção da estrutura enzimática causada por agentes (DOS SANTOS *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015e).

As propriedades de um suporte adequado para a imobilização de enzimas também são de grande importância (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; SANTOS *et al.*, 2015d). Neste contexto, um suporte deve ter superfície adequada para interação com as proteínas (SANTOS *et al.*, 2015d), além de possuir vários grupos reativos que podem reagir com a enzima a fim de permitir uma grande quantidade de ligações covalentes multipontuais. Nesta pesquisa, a quitosana foi escolhida como o suporte de imobilização, pois apresenta características interessantes, como baixo custo, renovável, biodegradável, insolúvel em água e pode ser utilizada em diferentes configurações geométricas, tais como pó, flocos, hidrogéis e membranas (KRAJEWSKA, 2004). Os grupos hidroxila (-OH) estão presentes nas estruturas gerais de biopolímeros, mas a principal diferença na estrutura da quitosana é a presença de grupos amino (-NH₂) (BERGER *et al.*, 2004).

No caso específico da quitosana, a modificação da sua estrutura química é necessária para obter um material quimicamente mais resistente e reduzir a sua capacidade de retenção de água (BERGER *et al.*, 2004). As reações envolvidas na reticulação por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxila da quitosana (ADRIANO *et al.*, 2008; BERGER *et al.*, 2004). Esta modificação pode ser realizada com vários agentes químicos. Não há relatos na literatura sobre o uso de quitosana ativada com divinilssulfona para imobilização de enzimas, este é o primeiro trabalho que se propõe a estudar este novo suporte, prometendo ser promissor, uma vez que a DVS é capaz de reagir com os grupos amino e hidroxila da quitosana e têm capacidade de estabilizar enzimas via ligação covalente multipontual (MATEO *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008b; SANTOS *et al.*, 2015a).

Neste trabalho, mostraremos os resultados de imobilização e estabilização em diferentes condições da lipase tipo B de *Candida antarctica* em quitosana ativada com DVS, afim de apresentar um novo suporte adequado para a realização de intensa imobilização covalente multipontual com enzimas. Estudou-se a quitosana em vários protocolos de ativação DVS, seguido da atividade hidrolítica contra diferentes substratos e a estabilidade da enzima imobilizada.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a imobilização da lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) em quitosana ativada com divinilssulfona (DVS), bem como a sua aplicação em reações modelo.

Objetivos Específicos:

- Estudo de protocolo de ativação do suporte quitosana com DVS através da alteração do pH da solução;
- Imobilização da enzima CALB nos suportes produzidos pelo método de ligação covalente;
- Avaliação dos parâmetros de imobilização e da estabilidade térmica dos diferentes derivados produzidos;
- Aplicação dos melhores biocatalisadores produzidos por ligação covalente da enzima CALB na reação modelo de hidrólise do hexanoato de etila.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

As enzimas atuam como biocatalisadores biológicos alterando a velocidade de reação com a diminuição da energia de ativação, sem alterar o equilíbrio da reação e sem serem consumidas. Esses biocatalisadores possuem excelentes propriedades funcionais o que permite sua utilização na catálise de processos químicos mais complexos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; SANTOS, 2015).

As enzimas realizam a catálise em condições suaves de temperatura, pH e pressão e na maioria das vezes em soluções aquosas, além de possuírem elevado nível de eficiência catalítica e grau de especificidade (KRAJEWSKA, 2004). Essas características das enzimas são diferenciais positivos para estas em relação aos catalisadores químicos, pois permitem uma redução no custo final do processo, uma vez que ocorre a redução do consumo de energia, da formação de subprodutos indesejáveis e da quantidade de resíduos (MENDES, 2009). Neste contexto, as enzimas têm sido estudadas a fim de desenvolver e melhorar a tecnologia enzimática em diversas áreas, como: alimentos, biocombustíveis, farmacêutica, dentre outras (ADRIANO, 2008; BEZERRA, 2012).

3.1.1 Lipases

As lipases são enzimas bastante usadas devido sua alta disponibilidade, não requerem cofatores e não catalisam reações paralelas além de possuírem quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade (JAEGER; EGGERT, 2002; RIOS, 2016; SCHMID; VERGER, 1998). São bastante utilizadas em catálises (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; EGGERT, 2002; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), devido a sua excelente atividade, especificidade, seletividade e robustez (ADLERCREUTZ, 2013; FAN; QIAN, 2010).

Podem ser encontradas em diversos organismos, como animais, plantas, fungos e bactérias. Operam em condições brandas de reação e em uma faixa de temperaturas e pressões que minimizam a formação de produtos laterais.

As lipases podem se manifestar sob duas conformações diferentes, uma aberta (ativa) e uma fechada (inativa). Na forma fechada a enzima exibe uma cadeia oligopeptídica helicoidal chamada "tampa" que isola o sítio ativo do meio reacional. A outra forma é a aberta, onde a "tampa" é deslocada por mudanças conformacionais e o sítio ativo é exposto ao meio reacional,

possibilitando a catálise, geralmente essa conformação ocorre na presença de superfícies hidrofóbicas (VERGER, 1997). Todas as lipases, apesar da divergência de sequência extensa, têm uma prega comum conhecida como dobra de hidrolase α/β e o sítio ativo das lipases é a tríade catalítica clássica composta de serina, aspartato/glutamato e histidina (CHERUKUVADA *et al.*, 2005).

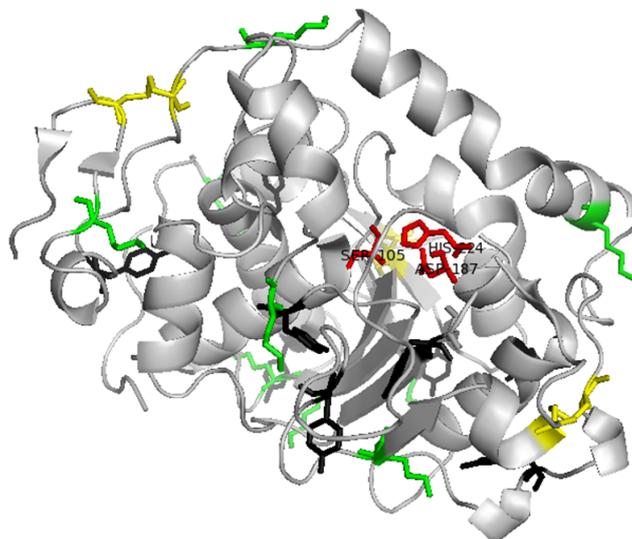
Seu mecanismo catalítico peculiar baseado na chamada mudança interfacial de conformação profunda lhes permite atuar na hidrólise de gotículas de óleo insolúvel, assim elas tendem a se adsorverem em qualquer superfície hidrofóbica (SCHMID; VERGER, 1998; VERGER, 1997). O uso de lipases como catalisadores industriais, estende-se a vários setores devido sua versatilidade frente às reações por elas catalisadas como reações de síntese de ésteres, fármacos, hidrólise de triacilgliceróis (SILVA *et al.*, 2012) aos ácidos graxos, entre outras, sendo bastante utilizadas em biocatálise (POPPE, 2012).

As propriedades das lipases podem variar de acordo com o gênero e espécie, podendo possuir massa molecular que varia entre 20 e 75 kDa, pH ótimo de atividade de 4 a 9 e atuar numa temperatura que pode chegar até 70 °C. No entanto, a maioria das lipases microbianas mostram atividade ótima entre pH 7-9 e temperatura ótima entre 30-40 °C (SILVA, 2012).

3.1.2 Lipase tipo B de *Candida antarctica*

A lipase tipo B de *Candida antarctica* (CALB) possui estrutura globular constituída de 317 resíduos de aminoácidos, massa molecular (MM) de 33 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 6,0 (UPPENBERG *et al.*, 1994). Possui ampla faixa de pH alcalino (7,0 a 10,0) em que se mantém estável, no entanto seu pH ótimo é 7,0. Na literatura encontrou-se a determinação preliminar da sequência e estrutura cristalina da CALB na qual, inicialmente, foi proposto que uma pequena hélice $\alpha 5$ poderia atuar como uma tampa (UPPENBERG *et al.*, 1994). A estrutura enzimática da CALB e os aminoácidos presentes em seu sítio ativo estão representados na Figura 1.

Figura 1 - Sítio ativo (vermelho); resíduos de cisteína (amarelo); resíduos tirosina (preto); resíduos de lisina (verde). A estrutura foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) utilizando pymol vs educacional. O código PDB para CALB é 1TCA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A CALB possui uso bastante diversificado devido sua elevada enantiosseletividade, regioseletividade, alta estabilidade, capacidade de atuação sobre vários substratos e tolerância em meios não aquosos com relação as demais lipases, além de ser estável em pHs ácidos (NICOLETTI, 2014). Sua utilização contempla uma grande variedade de campos industriais, além de estar comercialmente disponível na forma livre e imobilizada. Na forma imobilizada a CALB opera em ampla faixa de condições experimentais.

3.2 Imobilização de Enzimas

As enzimas solúveis além de possuir estabilidade moderada, podem sofrer inibição pelo produto ou substrato (LERESCHE; MEYER, 2006). Desta forma, a imobilização de enzimas é uma estratégia muito utilizada, a fim de: otimizar as características enzimáticas, permitir o reuso do biocatalisador e torná-lo economicamente viável, sendo requisito para a maioria de suas aplicações industriais (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). A possibilidade de reuso do biocatalisador apresenta, desta forma, mais uma vantagem em relação a enzima solúvel ou livre (MATEO *et al.*, 2007).

A estratégia de imobilização, se bem implementada em matrizes adequadas, pode impedir a degradação química e biológica da enzima e melhorar suas características, como: a estabilidade operacional, reativação da enzima (RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-

LAFUENTE, 2011), redução da inibição, entre outras (MATEO *et al.*, 2007). No entanto, a imobilização enzimática pode apresentar perda da atividade catalítica, limitações difusionais (GUISAN, 2006) e a interação enzima/suporte pode ocasionar mudanças conformacionais na estrutura da enzima, levando a sua desnaturação.

É de grande importância que durante a imobilização a enzima não desnature e não sofra limitações difusionais (GUISAN, 2006). Desta forma, o protocolo de imobilização deve ser bem analisado, com procedimento simples de forma a proporcionar um biocatalisador ativo e estável, com maior estabilidade operacional e redução dos custos do processo (SHELDON; VAN PELT, 2013a).

A escolha do método de imobilização é baseada na avaliação da atividade enzimática, desativação, propriedades finais desejadas, dentre outros (GUISAN, 2006). Assim, a enzima pode ser ligada a um suporte por adsorção física, ligação covalente, ligação iônica, ligação metálica, confinamento ou encapsulamento (MATEO *et al.*, 2006).

Neste trabalho, a imobilização foi realizada por ligação covalente multipontual que tem como característica ser uma ligação forte entre a enzima e o suporte. Desta forma, espera-se que o biocatalisador tenha maior estabilidade frente a alterações de condições ambientais. É o método mais investigado de imobilização e se destaca pelas propriedades conferidas aos derivados enzimáticos (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

A escolha do suporte para imobilização da enzima é de fundamental importância, pois as propriedades de um biocatalisador são regidas pelas características da enzima e do suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). O suporte deve apresentar estabilidade no pH e temperatura utilizada na reação química, resistência a ataque microbiano, funcionalidade química, durabilidade e capacidade de reutilização, elevada área superficial, compatibilidade aceitável com a enzima e com o substrato, tamanho e forma adequados, baixo custo e facilidade de manuseio (BEZERRA, 2012).

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos (BEZERRA *et al.*, 2015). Apesar dos suportes orgânicos possuírem grupos funcionais capazes de promover a ligação enzima-suporte, as enzimas imobilizadas se tornam mais ativas e estáveis quando um braço espaçador é introduzido entre a enzima e o suporte (VIEIRA, 2009). Os suportes inorgânicos possuem maior resistência química, física, térmica e microbiológica, no entanto os suportes orgânicos são mais utilizados para imobilizar as enzimas devido a grande variedade de grupos

funcionais reativos que podem ser "introduzidos" nestes (ADRIANO, 2008). Dentre os suportes orgânicos naturais em potencial crescente, destacam-se quitosana, fibra de casca de coco verde e bagaço de caju.

3.3 Quitosana

A quitosana é um polímero natural de baixo custo, renovável, biodegradável e insolúvel em água que possui diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, dentre outros (KRAJEWSKA, 2004). É obtida pela desacetilação da quitina (KRAJEWSKA, 2004) e precisa de um grau mínimo de desacetilação de 65% para ser considerada quitosana. Por ser um polímero natural apresenta vantagens sobre os polímeros sintéticos, uma vez que possui menos limitações quanto à biodegradação e biocompatibilidade (ADRIANO, 2008).

Na estrutura geral da quitosana estão presentes os grupos hidroxila (OH) e amino (NH_2) (MENDES *et al.*, 2011). A presença desses diferentes grupos funcionais, que são susceptíveis à modificações químicas, na estrutura da quitosana e sua cadeia linear de poliglicosamina com alta massa molecular tornam a utilização desse suporte mais atrativo para imobilização de enzimas com diferentes métodos de imobilização (SANTOS, 2011).

3.3.1 Grupos ativantes

3.3.1.1 Ativação com glioxila

A ativação de suportes com glioxila são descritas como muito apropriadas para obter uma ligação covalente multipontual intensa (DOS SANTOS *et al.*, 2015). Os grupos glioxila são aldeídos lineares que formam base de Schiff com os grupos aminos (MATEO *et al.*, 2005), desta forma a imobilização envolve apenas os grupos amino primários da proteína (DOS SANTOS *et al.*, 2015; GRAZU *et al.*, 2006), exceto quando são as proteínas com vários grupos amino terminais expostos no mesmo plano (GRAZU *et al.*, 2006).

Entretanto, esta característica dos suportes ativados com glioxila é uma das suas principais vantagens, uma vez que a imobilização de proteínas é produzida diretamente pela área de maior densidade de grupos reativos na superfície da proteína (grupos aminos primários) e não pelo grupo amino mais reativo (MATEO *et al.*, 2006).

3.3.1.2 Ativação com glutaraldeído

Os suportes ativado com glutaraldeído são muito diferente dos ativados com glioxila, apesar de ambos serem aldeídos. A ativação com glutaraldeído é umas das técnicas mais utilizadas para imobilizar enzimas (BETANCOR *et al.*, 2006) e é aplicada para produzir ligações muito estáveis ao reagir com os grupos aminos da enzima (MATEO *et al.*, 2005) podendo o suporte ativado ser lavado com a permanência do glutaraldeído (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1993; MATEO *et al.*, 2005). A metodologia de ativação é bastante simples e eficiente podendo em alguns casos melhorar a estabilidade enzimática pela imobilização multipontual, entretanto uma adsorção física pode ocorrer antes da reação covalente (BETANCOR *et al.*, 2006).

A ativação de suportes com glutaraldeído, apesar de produzir ligações muito estáveis possui baixa estabilidade em pH alcalino (DOS SANTOS *et al.*, 2015), pois a elevada reatividade destes grupos nestes pHs torna-os muito instáveis. Nestes pHs alcalinos a reatividade dos resíduos de Lys podem ser mais adequadas para a reação (MATEO *et al.*, 2005), assim, as proteínas devem ser, principalmente, imobilizadas através do grupo amino terminal quando se utilizam estes suportes a valores de pH neutros.

Outro aspecto a ser considerado é que o glutaraldeído é utilizado para ativar suportes aminados. Desta forma, embaixo de cada molécula de glutaraldeído pode haver grupos amino que, por sua vez, podem conferir algumas características de permutados iônico ao suporte (BETANCOR *et al.*, 2006) que podem ser considerados como matrizes heterofuncionais. Assim, a busca de novos grupos reativos para ativação de suporte, que seja potencialmente útil para estabilizar enzimas através de ligação covalente multipontual, ainda é uma demanda na preparação de biocatalisadores.

3.3.1.3 Ativação com epóxido

A ativação dos suportes com epóxido leva a uma estabilidade durante o armazenamento e também quando suspensos em meio aquosos neutros (MATEO *et al.*, 2002), podem reagir com uma vasta gama de grupos de proteínas como amino, tiol, fenol, imidazol, carboxila.

Estes suportes são muito estáveis a pH neutros (MATEO *et al.*, 2000) e são capazes de formar ligações covalentes estáveis com os diferentes grupos de proteínas, em condições experimentais brandas. No entanto, é difícil conseguir uma ligação covalente multipontual muito intensa em comparação com outras ativações, como: os suportes de glioxila (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

Os suportes epóxido são aplicados para imobilizar grandes quantidades de enzimas sob condições experimentais suaves e ao final da imobilização, os grupos epóxido livres podem ser bloqueados com compostos de tiol ou amina, sob condições suaves (MATEO *et al.*, 2000).

3.3.1.4 Ativação com divinilssulfona

Os suportes ativados com divinilssulfona (DVS) podem reagir com os grupos amino, fenol, imidazol ou tiol das proteínas (DOS SANTOS *et al.*, 2015) sendo bastante úteis para obter muitas ligações enzima/suporte. Os grupos vinil-sulfona têm estabilidade em uma ampla faixa de valores de pH (4 a 10), possuem natureza hidrofóbica, o que permite que sua estabilização seja mais elevada, em alguns casos, do que para outros grupos, tais como: glioxila (HILTERHAUS *et al.*, 2008) e glutaraldeído (SANTOS *et al.*, 2015d).

A incubação prolongada, destes grupos, em pH alcalino pode favorecer ligações enzima/suporte aumentando a rigidez da enzima e evitando alterações na distorção da estrutura enzimática causada por agentes (SANTOS *et al.*, 2015e). No entanto, após a ativação do suporte com divinilssulfona é necessário o bloqueio com nucleófilos, como a etilenodiamina, para eliminar a reatividade química do suporte (SANTOS *et al.*, 2015a).

A ativação com divinilssulfona vem sendo bastante estudada, no entanto ainda não encontrou-se relatos da utilização deste suporte na ativação de quitosana, como mostra a Tabela 1. Tabela 1 - Grupos utilizados para ativar o suporte quitosana na literatura.

Suporte	Grupo ativante	Autor
Quitosana	Glioxila	(KOMESU <i>et al.</i> , 2009; RODRIGUES <i>et al.</i> , 2008b)
Quitosana	Glutaraldeído 2%	(MANZO <i>et al.</i> , 2015; SILVA <i>et al.</i> , 2012)
Quitosana	Glutaraldeído 5%	(ADRIANO, 2008; SILVA <i>et al.</i> , 2008, 2012)
Quitosana	Glutaraldeído 25%	(BATISTA DA SILVA <i>et al.</i> , 2015)
Quitosana	Glioxila-EDA	(NETA <i>et al.</i> , 2012)
Quitosana	Glioxila-EDA-Glutaraldeído	(SILVA <i>et al.</i> , 2012)
Quitosana	Glicidol	(MENDES <i>et al.</i> , 2011; RODRIGUES <i>et al.</i> , 2008b)
Quitosana	Epicloridrina	(ADRIANO, 2008; MENDES <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: Elaborada pelo autor.

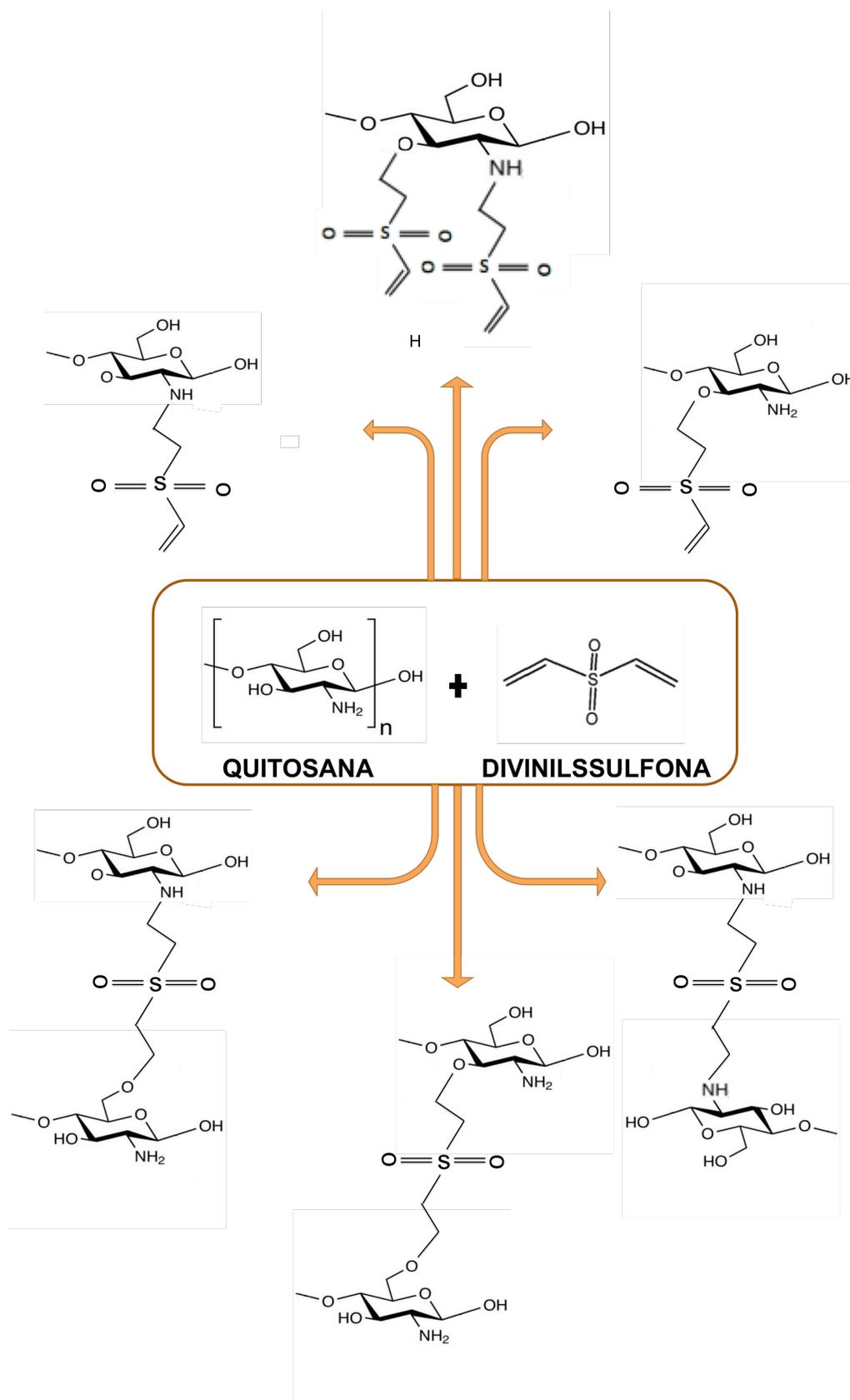
3.3.2 Ativação do suporte quitosana com divinilssulfona

No caso específico da quitosana, a modificação da sua estrutura química é necessária para obter um suporte quimicamente mais resistente ao meio ácido e reduzir a sua capacidade de retenção de água (BERGER *et al.*, 2004). As reações envolvidas no crosslinking por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxila da quitosana (ADRIANO *et al.*, 2008; BERGER *et al.*, 2004).

Estas reações podem ser realizadas homogeneamente adicionando o agente bifuncional (por exemplo., divinilssulfona) com solução de quitosana, ou heterogeneamente com a adição do agente a quitosana nas formas de membranas e pérolas. Esta modificação pode ser realizada com vários agentes químicos, tais como glicidol, epícloridrina, glutaraldeído, glioxilo, genipina e formaldeído para formar estruturas complexas, amplamente divulgados na literatura (ADRIANO *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2005; LI; BAI, 2005; MANRICH *et al.*, 2010; MONTEIRO; AIROLDI, 1999; MUZZARELLI, 2009; ZHOU *et al.*, 2010).

A quitosana possui grupos amino e hidroxila reativos que, após outras modificações químicas, podem fazer ligações covalentes com grupos reativos da enzima (RODRIGUES *et al.*, 2008b). A reação de quitosana com DVS ocorre com o ataque nucleofílico dos grupos grupos aminos da quitosana à divinilssulfona (DOS SANTOS *et al.*, 2015; ORTEGA-MUÑOZ *et al.*, 2010; SIMPKINS, 1990). A ligação covalente entre os grupos amino do polímero e a os grupos vinil sulfona resiste a diferentes pH e temperatura (DOS SANTOS *et al.*, 2015; ORTEGA-MUÑOZ *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2015a, 2015b), como é mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo de ativação da quitosana com divinilssulfona (DVS) sob valor de pH alcalino, seguida da formação do complexo quitosana-vinilsulfona. O mecanismo também exibe as possibilidades de ligações cruzadas ativadas com grupos presentes na superfície do próprio suporte.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A alta reatividade dos grupos DVS pode contribuir para o crosslink entre dois grupos amino de quitosana e uma molécula de DVS (DOS SANTOS *et al.*, 2015; ORTEGA-MUÑOZ *et al.*, 2010), ou o crosslink também pode ocorrer para uma molécula de DVS devido à sua polimerização sob certas condições, por exemplo, a valores de pH elevados.

3.4. Hidrólise do hexanoato de etila

A reação enzimática surge como uma alternativa promissora, devido as condições de reações brandas utilizadas (HAN *et al.*, 2009) na hidrólise do hexanoato de etila. Esta reação é utilizada na indústria de alimentos e na indústria de cosméticos. A hidrólise do hexanoato de etila forma o ácido hexanóico e o álcool etanol. Este, por sua vez, pode ser utilizado como combustível misturado a gasolina ou no diesel e ainda como matéria prima de tintas, solventes, dentre outros.

3.5 Ligação covalente

A ligação covalente é uma das estratégias mais utilizadas para imobilizar enzimas, uma vez que os biocatalisadores possuem uma maior estabilidade da ligação e carga enzimática constante após a imobilização além de que estes biocatalisadores podem ser utilizados em reatores contínuos, fixo, leito fluidizado, dentre outros (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). Uma maior resistência à inativação por temperatura, pH ou solventes orgânicos é dada ao biocatalisador quando ligação multipontual é realizada.

Na literatura encontra-se ensaios que confirmam a formação de ligação covalente. Um destes ensaios é a separação de macromoléculas em um campo elétrico (eletroforese ou SDS-PAGE) em que é utilizado um gel de poliacrilamida, onde ocorre a separação das proteínas por diferença de massa molecular, e um tampão de ruptura contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) que quebra a proteína em suas cadeias polipeptídicas individuais (LAEMMLI, 1970). Quando a ligação ocorre por adsorção essas enzimas são liberadas para o meio e detectadas no gel de poliacrilamida. No entanto, quando a ligação ocorre de forma covalente não é detectado nenhuma banda no gel de poliacrilamida, pois a enzima permanece no suporte.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As soluções de CALB (6,5 mg de proteína/mL) foram adquiridas da Novozymes (Espanha). A quitosana em pó, foi adquirido pela Sigma-Aldrich. A divinilssulfona, etilenodiamina (EDA), Triton X-100 e butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) foram adquiridos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de qualidade analítica.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da quitosana

O gel de quitosana a 2,5% (m/v) foi preparado como descrito na literatura (ADRIANO *et al.*, 2005), com modificações. Primeiro, 10 gramas de quitosana foram dissolvidas em 400 mL de solução de ácido acético 5% (v/v) durante 30 minutos, sob agitação. Depois disso, a solução foi colocada em 3,6 L de NaOH 0,1 M (v/v) e mantida sob agitação moderada durante 4 h a 25 °C. Em seguida, filtrou-se o suporte e lavou-se até à neutralidade, o que foi verificado utilizando fenolftaleína como indicador.

4.2.2 Ativação do suporte

A estratégia inicial de ativação da quitosana foi conduzida de acordo com a metodologia previamente descrita na literatura (Santos *et al.*, 2015). Inicialmente, 10 gramas de quitosana foram adicionados a 200 mL de solução de carbonato de sódio 333 mM contendo 7,5 mL de divinilssulfona (DVS). O sistema resultante foi mantido sob agitação constante durante 35 minutos à 25 °C. Depois lavou-se o suporte com excesso de água destilada e armazenou-se a 4 °C. A influência do pH no passo de ativação foi investigada estudando o pH da solução de carbonato de sódio nos valores de 10, 12,5 e 14.

4.2.3 Caracterização dos suportes produzidos

A quitosana foi caracterizada por diferentes técnicas, como: Difração de Raio X (DRX), Espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e análise elementar. Os padrões de difração DRX foram registrados em um modelo PANalytical com difratometria EMPYREAN

com trocador automático e suporte de amostra rotatória, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ (1.5406 Å). As amostras foram medidas num ângulo elevado na gama (2θ): 10 – 70° durante 30 minutos. Os espectros de FTIR foram obtidos num modelo de espectroscopia de infravermelhos Bruker Vertex 70, utilizando um acessório: Golden Gate Single Reflection Diamond ATR System. As amostras foram medidas na faixa de 4000 – 500 cm^{-1} .

4.2.4 Imobilização da CALB em DVS-Quitosana

Inicialmente, a imobilização foi realizada utilizando 7,14 U/g de suporte (0,2 mg de proteína por g de suporte seco). A imobilização de CALB em quitosana, ativada com divinilssulfona foi conduzida na presença de 0,01% de Triton-X e de tampão bicarbonato pH 10 (5 mM) a 25 °C, durante 24 horas, sob agitação de acordo com a literatura com modificações (SANTOS *et al.*, 2015a). O detergente foi utilizado para evitar a adsorção de lipase no suporte ou para quebrar os dímeros da enzima (Palomo *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015c; Santos *et al.*, 2015d). Suspendeu-se 1 g de suporte, ativado a pH 10, 12,5 ou 14, em 10 mL de solução enzimática (concentração máxima de proteína 1 mg/mL). Em seguida, incubou-se a enzima imobilizada em 100 mM de tampão bicarbonato a pH 10 (1:10 m/v) a 25 °C, durante 24 h ou 48 h. A ligação covalente multipontual tem sido relatada como sendo um processo complexo e lento, que requer tempo e condições de pH que possam aumentar a reatividade enzima/suporte. Deste modo, escolheu-se a incubação da enzima imobilizada a pH 10 como boa condição para obter uma ligação covalente multipontual intensa (SANTOS *et al.*, 2015a, 2015b, 2015e). Como ponto final da reação, a enzima imobilizada foi incubada em etilenodiamina (EDA) 1M pH 10 por 6 horas ou 24 horas a 4 °C ou 25 °C para bloqueio dos grupos livres reativos do suporte (DOS SANTOS *et al.*, 2015). Finalmente, as enzimas imobilizadas foram lavadas com excesso de água destilada, secas a vácuo e armazenadas a 4 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são relatados como a média desse valor e o desvio padrão (usualmente abaixo de 10%). A Tabela 3 mostra o esquema com as variáveis avaliadas em cada caso.

4.2.5 Determinação da atividade enzimática e da concentração de proteína

A atividade hidrolítica de CALB solúvel e imobilizada foi determinada de acordo com a metodologia previamente descrita na literatura (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014a), com modificações. O butirato de *p*-nitrofenila (p-NPB 50 mM) foi utilizado como substrato em tampão de fosfato de sódio pH 7,0 (25 mM) a 25 °C, sob agitação, e o produto *p*-nitrofenol foi

quantificado espectrofotometricamente a 400 nm ($\epsilon = 10.052 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014a; SOUZA *et al.*, 2016). Para a enzima solúvel, foram adicionados 30-100 μL de solução de lipase a 2,5 mL de solução de substrato. No caso da enzima imobilizada, adicionou-se 0.01-0.1 gramas a 25,5 mL de solução de substrato. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de *p*-NPB por minuto nas condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método descrito na literatura (BRADFORD, 1976) e utilizou-se albumina de soro bovino como referência.

4.2.6 Parâmetros de imobilização

A partir dos resultados obtidos no processo de imobilização, foram determinados os valores de rendimento de imobilização (%), atividade do derivado e atividade recuperada, de acordo com a literatura (SILVA *et al.*, 2012), como é mostrado nas equações 1, 2 e 3.

Determinou-se o rendimento de imobilização (%) pela diferença entre a atividade inicial da solução enzimática (At_i) e a atividade do remanescente ou sobrenadante (At_f), de acordo com a Equação 1:

$$R(\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} * 100 \quad (1)$$

A atividade do derivado (U/g) foi determinada pelo inclinação da curva (α) em abs/min, fator da curva de calibração do *p*-nitrofenol (*p*NP) em $\mu\text{mol/mL.abs}$, volume de reação (V_R) em mL e a massa do suporte (M_S) em g, de acordo com a Equação 2:

$$At_d = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r}{M_S} \quad (2)$$

A atividade teórica (At_t) da enzima imobilizada em % pode ser calculada usando a quantidade de enzima oferecida/g de suporte ($At_{oferecida}$ - U/g suporte) e o rendimento de imobilização, como pode ser visto na Equação 3:

$$At_t = R \times At_{oferecida} \quad (3)$$

Após a medição da atividade da enzima imobilizada (At_d - U/g suporte), calculou-se a atividade recuperada utilizando a Equação 4.

$$At_r = \frac{At_d}{At_t} * 100 \quad (4)$$

4.2.7 Estabilidade Térmica a 60°C

A determinação da inativação térmica foi realizada através da incubação de diferentes derivados em 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7 a 60 °C. Periodicamente, as amostras foram retiradas e a atividade remanescente foi medida utilizando o ensaio *p*-NPB, descrito acima. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para cada derivado imobilizado foi calculado de acordo com o modelo de desativação enzimática (HENLEY; SADANA, 1985).

4.2.8 Análise qualitativa de proteínas SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada de acordo com a literatura (LAEMMLI, 1970). A preparação do tampão de ruptura e o seu uso foram baseados na metodologia apresentada na literatura (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014b). Uma massa de 100 mg de enzima imobilizada foi colocada em contato com o tampão de ruptura a 100 °C. O marcador LMW-SDS (GE Healthcare Life Sciences) foi utilizado como padrão de peso molecular. Utilizou-se um gel de separação de poliacrilamida a 12%, o qual foi submetido a uma tensão constante de 150 V numa tetra-célula de Miniprotean (Biorad). Após a corrida, os géis foram corados com azul de cromassie.

4.2.9 Efeito do pH na imobilização

O melhor protocolo de ativação de suporte foi escolhido e, em seguida, a enzima foi imobilizada neste suporte (0.2 mg de proteína/g de suporte). A imobilização ocorreu na presença de 0,01% de Triton-X e em diferentes tampões. Foram escolhidos três tampões diferentes: tampão acetato de sódio pH 5 (5 mM), tampão fosfato de sódio pH 7 (5 mM) e tampão carbonato de sódio pH 10 (5 mM), a 25 ° C durante 24 horas, sob agitação.

4.3 Hidrólise do hexanoato de etila

A imobilização foi realizada utilizando carga alta (14 mg de proteína/g de suporte úmido). A atividade da enzima imobilizada foi determinada utilizando hexanoato de etila 25 mM em 50% de CH₃ CN/50% de tampão 50 mM. As reações foram conduzidas em diferentes valores de pHs utilizando três diferentes tampões: acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 e carbonato de sódio a pH 9,2. Todos os experimentos foram realizados por 30 min a 25 °C, sob agitação. A área de cada pico foi analisada por Thermo Scientific -HPLC (Finnigan Surveyor com um detector de UV PDA) utilizando uma coluna Kromasil C18 (15 cm x 0,46 cm) e a conversão foi calculada a

partir da relação das áreas, referente ao substrato, obtidas a partir da reação com a área obtida a partir do substrato na concentração inicial. Injetou-se uma amostra de 20 μL e a taxa de fluxo para a fase móvel foi de 1,0 mL/min. Utilizou-se acetonitrila/solução aquosa de acetato de amónio 10 mM (50:50, v/v) e pH 3,2 como fase móvel e a detecção UV foi realizada a 208 nm (SANTOS et al., 2015a). O ácido hexanóico tem um tempo de retenção de 3,57 min enquanto o éster tem um tempo de retenção de 15,42 min. A atividade foi determinada em triplicata com conversão máxima de 20-30 % (SANTOS et al., 2015a). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido hexanóico por minuto nas condições descritas acima.

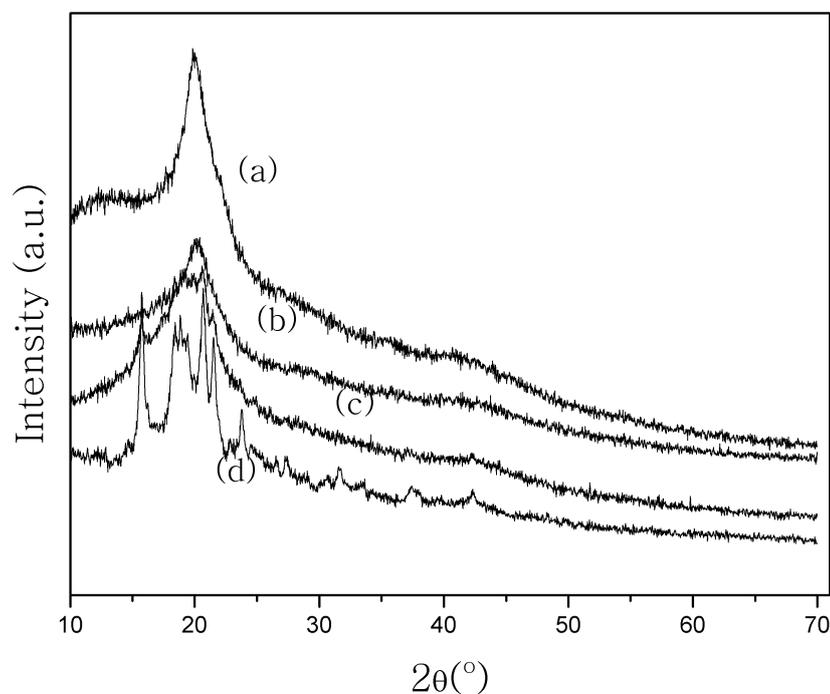
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização do suporte quitosana ativado com divinilssulfona

5.1.1 Difração de Raio-X (DRX)

A amostra de quitosana pura apresenta uma banda larga na faixa de 15 - 24 ° com pico máximo $2\theta = 20^\circ$, que corresponde à forma cristalina polimórfica II (ZHANG *et al.*, 2006). No entanto, a presença desta banda também indica que o polímero não tem um arranjo cristalino a distâncias interatômicas longas. O processo de ativação com grupos DVS a pH 10 e 12,5 provoca uma ligeira diminuição deste pico. Isto indica uma perda da forma cristalina polimórfica do suporte. Quando o processo de ativação com grupos DVS é conduzido a pH 14, a forma cristalina polimórfica do material é perdida, uma vez que o pico desaparece a 20° . Os padrões XDR de ângulo elevado para as amostras de quitosana são mostrados na Figura 3.

Figura 3 - Padrões XDR das amostras de quitosana. (A) quitosana pura; (B) Quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10; (C) quitosana ativada com divinilssulfona a pH 12,5; (D) Quitosana ativada com divinilssulfona a pH 14.

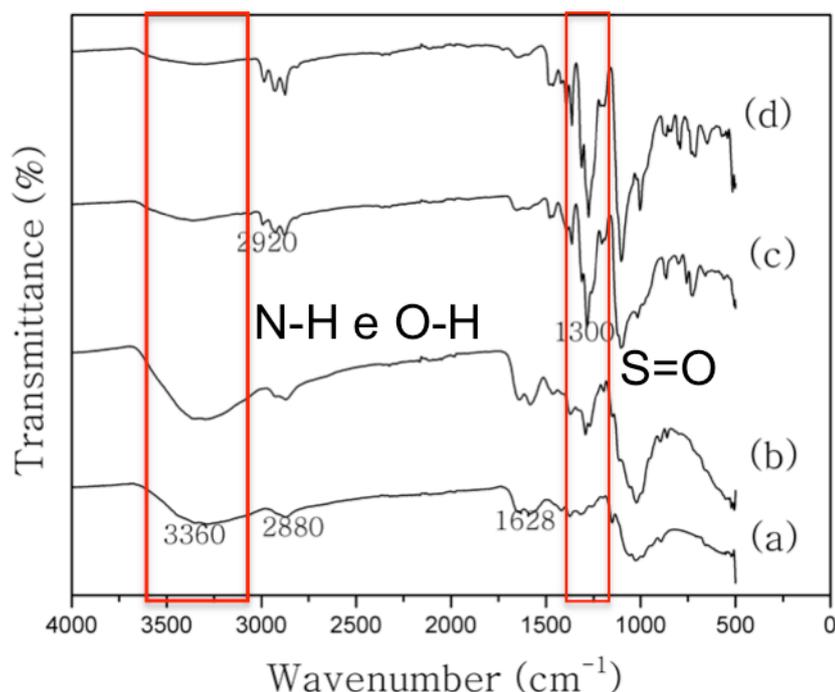


Fonte: Elaborada pelo autor

5.1.2 Espectroscopia de ATR-FTIR

A banda larga a 3360 cm^{-1} representa a vibração de estiramento de grupos N-H e O-H presentes na estrutura da quitosana (GREGORIO-JAUREGUI *et al.*, 2012; PAWLAK; MUCHA, 2003). Na Figura 4, observa-se que existe uma redução desta banda com o aumento do pH de ativação da quitosana com divinilssulfona. Isto demonstra uma possível substituição destes grupos pelo agente de ativação. As bandas a 2920 e 2880 cm^{-1} representam a vibração de estiramento simétrica ou assimétrica atribuída ao anel de piranose de quitosana (GREGORIO-JAUREGUI *et al.*, 2012). Isto indica que as amostras de quitosana não perdem a sua estrutura principal durante o processo de ativação, uma vez que estes picos estão presentes em todas as amostras, como pode-se observar na Figura 4.

Figura 4 - Espectros FTIR das amostras de quitosana. (A) quitosana pura; (B) quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10; (C) quitosana ativada com divinilssulfona a pH 12,5; (D) quitosana ativada com divinilssulfona a pH 14.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, a redução da banda a 1540 cm^{-1} , que representa a vibração angular de grupos N-H (RAMYA; SUDHA; MAHALAKSHMI, 2012), mostra que aqueles grupos na superfície da quitosana reagiram quase completamente com divinilssulfona. A banda a 1300 cm^{-1} é

característica dos grupos S = O, que estão presentes na divinilssulfona. Pode ser observado na Figura 4 que esta banda surge apenas nas amostras de quitosana ativadas com DVS, mostrando que o processo de ativação do suporte foi eficiente. Além disso, a banda a 1300 cm^{-1} aumenta com o pH da ativação, o que pode ser atribuído ao aumento na quantidade de grupos DVS na superfície do suporte. A análise elementar, discutida a seguir, reforça essa informação.

5.1.3 Análise Elementar

A Tabela 2 mostra os resultados da análise elementar (percentagem de C, H, N e S) de quitosana pura e quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10, 12,5 e 14. A percentagem de carbono e hidrogênio na quitosana não foi significativamente alterada quando comparada com a percentagem de nitrogênio e enxofre, indicando que a divinilssulfona reage com os grupos hidroxila (OH) e amino ($-\text{NH}_2$) (DOS SANTOS *et al.*, 2015; LOPEZ-JARAMILLO *et al.*, 2012; MORALES-SANFRUTOS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2015a).

Tabela 2 - Análise elementar (carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre) de quitosana pura, quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10, 12,5 e 14. Outras especificações foram descritas nos métodos.

Material	% C	% H	% N	% S
Quitosana pura	36,8	6,2	6,8	0,2
Quitosana ativada a pH 10	34,8	5,5	5,1	3,9
Quitosana ativada a pH 12,5	37,3	5,9	3,4	13,0
Quitosana ativada a pH 14	33,4	5,4	0,9	18,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando o suporte foi ativado a pH 10, nota-se pouca ativação com divinilssulfona, em comparação com os outros pHs estudados. No entanto, neste pH, há 3,9% de S e 5,1% de N versus 0,2% de S e 6,8% de N em quitosana pura, mostrando que ocorreu a ativação do suporte. Melhores resultados foram obtidos a pH 12,5, uma vez que aumentou a percentagem de enxofre e diminuiu-se a percentagem de nitrogênio (13% de S e 3,4% de N).

Observou-se a partir da Tabela 2 que a pH 14 obtiveram-se os melhores resultados de ativação de suporte com divinilssulfona, 18,7% de S e 0,9% de N. Estes resultados indicam uma elevada ativação dos grupos amino primários de quitosana com divinilssulfona, uma vez que a pH alcalino os grupos aminos e hidroxil estão ionizados facilitando a ligação com os grupos vinil sulfona. Esta modificação na composição química melhorou a estrutura de suporte, introduzindo

mais grupos reativos neste, o que pode permitir um maior acesso aos grupos de proteínas e melhorar os processos de imobilização (SANTOS *et al.*, 2015d).

5.2. Parâmetros de Imobilização e Inativação Térmica

De acordo com a metodologia descrita em 4.2.2, a quitosana foi ativada com divinilssulfona em três pHs diferentes (10, 12,5 e 14). Em seguida, a CALB foi imobilizada nestes suportes e o melhor rendimento de imobilização foi atingido quando a quitosana foi ativada com divinilssulfona a pH 12,5 (79,4%). Nesta condição, o biocatalisador também apresentou alto valor de atividade do derivado e atividade recuperada, antes da incubação em tampão e bloqueio com EDA, $2,59 \pm 0,06$ U/g e $45,65 \pm 0,76\%$, respectivamente.

A pH 10 e 14, obtiveram-se resultados semelhantes de rendimento (68,13% e 74,8%, respectivamente), atividade do derivado ($1,83 \pm 0,14$ e $1,84 \pm 0,15$ U/g, respectivamente). Isto pode ter ocorrido porque a ativação a pH 14 introduz mais grupos vinil sulfona no suporte do que quando a ativação ocorre a pH 10. Estes grupos podem formar ligações multipontuais com a enzima e podem ter causado uma distorção na estrutura enzimática (MATEO *et al.*, 2007). Outra possibilidade é que não sejam estáveis quando introduzidos a este pH extremo, uma vez que os grupos vinil sulfona são bastante estáveis a uma gama de pH entre 4 e 10 (DOS SANTOS *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015a).

A Tabela 3 mostra os tempos de meia-vida para cada biocatalisador produzido neste trabalho. A meia-vida da enzima solúvel, realizada nas mesmas condições, foi inferior a 3 minutos. Obtiveram-se melhores resultados de estabilidade térmica quando a imobilização ocorreu em quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10, uma vez que dois biocatalisadores, 10C (entrada 3) e 10D (entrada 4), não atingiram o seu tempo de meia-vida a 60 °C após 48 h e 24 h, respectivamente. Estes biocatalisadores são mais de 960 vezes e 480 vezes mais estáveis do que a enzima livre, respectivamente. Estes resultados também indicam que houve ligação multipontual entre a enzima e o suporte. Estes biocatalisadores foram mais estáveis do que o obtidos por Rodrigues *et al.* (RODRIGUES *et al.*, 2008a) que por sua vez imobilizou CALB em quitosana ativada com glutaraldeído (3mg de proteína/g de suporte) por 24 horas obtendo rendimento de 90% e atividade do derivado de 295 U/g. Apesar da imobilização de CALB em quitosana-glutaraldeído ter obtido maior rendimento e atividade em relação a imobilização de CALB em quitosana-DVS o tempo de meia vida para os biocatalisadores imobilizados em quitosana-DVS foram maiores do que o biocatalisador quitosana-glutaraldeído que por sua vez obteve tempo de meia vida de 324 min a 50 °C.

Tabela 3 - Resultados de inativação térmica dos biocatalisadores a 60°C, rendimento de imobilização (%) e atividade do derivado (U/g). Outras especificações foram descritas em métodos. Tempo de meia vida da enzima livre foi inferior a 3 minutos.

Entrada	pH de ativação	Incubação em tampão (h)	Tempo de contato com EDA (h)	Temperatura (°C)	Código	Rendimento (%)	Afd (U/g)	Meia-vida (minutos)
1	10	24	6	4	10A	68.13 ± 0.46	1.96 ± 0.07	64
2	10	24	6	25	10B	68.13 ± 0.46	0.72 ± 0.1	32,7
3	10	24	24	4	10C	68.13 ± 0.46	1.78 ± 0.03	>2880
4	10	24	24	25	10D	68.13 ± 0.46	1.73 ± 0.03	>1440
5	10	48	6	4	10E	68.13 ± 0.46	1.68 ± 0.03	88
6	10	48	6	25	10F	68.13 ± 0.46	1.6 ± 0.07	347,12
7	10	48	24	4	10G	68.13 ± 0.46	1.34 ± 0.07	355,94
8	10	48	24	25	10H	68.13 ± 0.46	1.5 ± 0.0	770,16
9	12.5	24	6	4	12.5A	79.37 ± 1.32	1.99 ± 0.03	21,8
10	12.5	24	6	25	12.5B	79.37 ± 1.32	2.19 ± 0.1	18,9
11	12.5	24	24	4	12.5C	79.37 ± 1.32	2.87 ± 0.03	54,22
12	12.5	24	24	25	12.5D	79.37 ± 1.32	0.62 ± 0.0	4,37
13	12.5	48	6	4	12.5E	79.37 ± 1.32	1.86 ± 0.07	25,46
14	12.5	48	6	25	12.5F	79.37 ± 1.32	1.16 ± 0.03	37,18
15	12.5	48	24	4	12.5G	79.37 ± 1.32	1.55 ± 0.1	17,8
16	12.5	48	24	25	12.5H	79.37 ± 1.32	0.62 ± 0.0	23,76
17	14	24	6	4	14A	74.8 ± 4.0	0.64 ± 0.03	34,4
18	14	24	6	25	14B	74.8 ± 4.0	0.46 ± 0.0	3,36
19	14	24	24	4	14C	74.8 ± 4.0	1.11 ± 0.03	74,58
20	14	24	24	25	14D	74.8 ± 4.0	0.36 ± 0.0	11,13
21	14	48	6	4	14E	74.8 ± 4.0	0.70 ± 0.03	3,29
22	14	48	6	25	14F	74.8 ± 4.0	0.56 ± 0	6,87
23	14	48	24	4	14G	74.8 ± 4.0	0.33 ± 0.3	18,69
24	14	48	24	25	14H	74.8 ± 4.0	0.12 ± 0.03	37,46

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados dos tempos de meia-vida obtidos mostram que a imobilização otimizou as características enzimáticas, uma vez que a maioria dos biocatalizadores produzidos eram pelo menos 4 vezes mais estáveis do que a enzima livre, exceto 12.5D (entrada 12), 14B (entrada 18) e 14E (entrada 21). A partir da tabela 3 observa-se que os melhores resultados de tempo de meia-vida para suportes ativadas a pH 10, 12.5 e 14 foram >2880 min (10C, entrada 3), 54,22 min (12.5C, entrada 11) e 74,58 min (14C, entrada 19), respectivamente. Além disso, pode-se observar que estes mesmos derivados obtiveram as melhores atividades: 1.78 ± 0.03 U/g (10C, entrada 3), 2.87 ± 0.03 U/g (12.5C, entrada 11) e 1.11 ± 0.03 U/g (14C, entrada 19). Assim, obteve-se os melhores resultados para os procedimentos de incubação em tampão durante 24 h, seguido por contato com EDA durante 24 h a 4 °C. Finalmente, pode-se observar que todos os ensaios dos derivados ativados a pH 10 obtiveram melhores resultados em relação aos outros pHs.

A partir da tabela 3 observou-se que na maioria das imobilizações realizadas em tampão de carbonato de sódio pH 10 (5 mM) durante 48 h não conduziu a um aumento significativo das imobilizações quando comparadas com as realizadas em tampão de carbonato de sódio pH 10 (5 mM) durante 24 horas, como por exemplo os derivados 10A (entrada 1) e 10E (entrada 5) que obtiveram tempo de meia-vida de 64 e 88 minutos, respectivamente. Isto pode ser explicado porque com 48 h de contato, a enzima pode sofrer distorções causadas pela reação enzima-suporte, não apresentando efeitos positivos na atividade enzimática e na estabilidade térmica (SANTOS *et al.*, 2015c). Em oposição à incubação, observou-se que um maior tempo de contato (24 h) durante o bloqueio com EDA favoreceu tanto a atividade quanto a estabilidade do biocatalisador. Isto deve ter ocorrido porque mais tempo de contato permitiu que o nucleófilo (etilenodiamina) eliminasse a reatividade química de suporte, evitando ligações covalentes indesejadas (BARBOSA *et al.*, 2012; DOS SANTOS *et al.*, 2015).

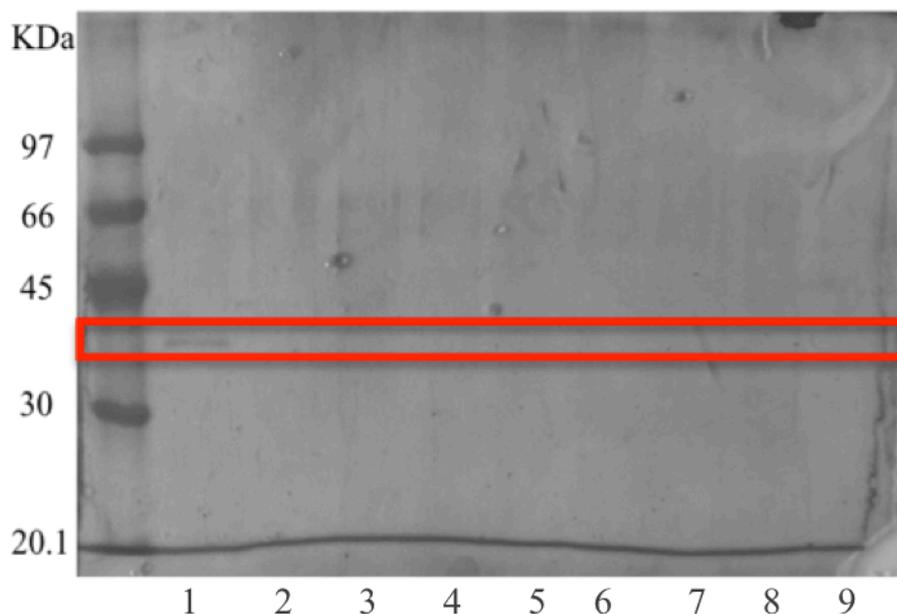
A partir da análise da Tabela 3 não foi possível obter uma conclusão do comportamento referente à influência da temperatura no tempo de meia-vida dos biocatalisadores, uma vez que as atividades e estabilidades observadas também foram influenciadas por outros fatores. No entanto, os melhores resultados foram obtidos a uma temperatura de 4 °C (biocatalisadores 10C, 12.5C e 14C). Isto, provavelmente, ocorreu devido à temperatura mais baixa utilizada diminuir a velocidade de bloqueio dos grupos vinil sulfona, livres da superfície de suporte, sendo menos agressiva e evitando, assim, a distorção da estrutura enzimática e, portanto, a sua desativação.

5.3 Análises qualitativa de proteína SDS-PAGE

Os ensaios de eletroforese foram realizados para as enzimas imobilizadas. As amostras de enzimas imobilizadas em quitosana ativadas a pH 10, 12,5 e 14 foram inativadas a 100 °C na presença de tampão de ruptura. Estas condições de inativação devem liberar todas as enzimas adsorvidas a partir do suporte através de interações hidrofóbicas ou iônicas. Os baixos volumes utilizados permitem a detecção de uma quantidade mínima de moléculas de enzima liberadas sob essas condições drásticas e é um método usualmente utilizado para este objetivo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; RUEDA *et al.*, 2016a, 2016b; SUESCUN *et al.*, 2015; VERDASCO-MARTÍN *et al.*, 2016).

A eletroforese dos derivados obtidos a partir da imobilização da enzima CALB no suporte quitosana ativado com divinilssulfona em solução a pH 10 é mostrada na Figura 5.

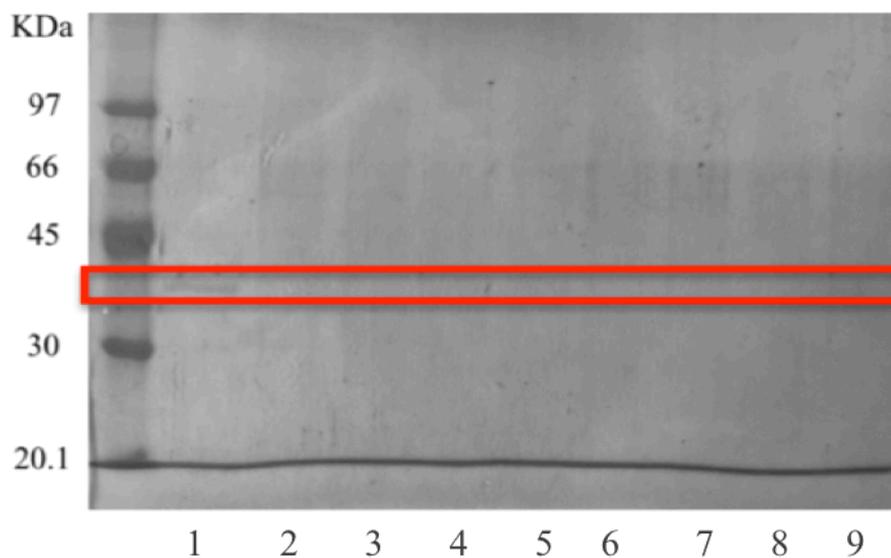
Figura 5 - Eletroforese da lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana ativada com divinilssulfona a pH 10. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: extrato enzimático; Poço 3: 10A; Poço 4: 10B; Poço 5: 10C; Poço 6: 10D; Poço 7: D10E; Poço 8: 10F; Poço 9: 10G; : Poço 10: 10H.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A eletroforese dos derivados obtidos a partir da imobilização da enzima CALB no suporte quitosana ativado com divinilssulfona em solução a pH 12,5 é mostrada na Figura 6.

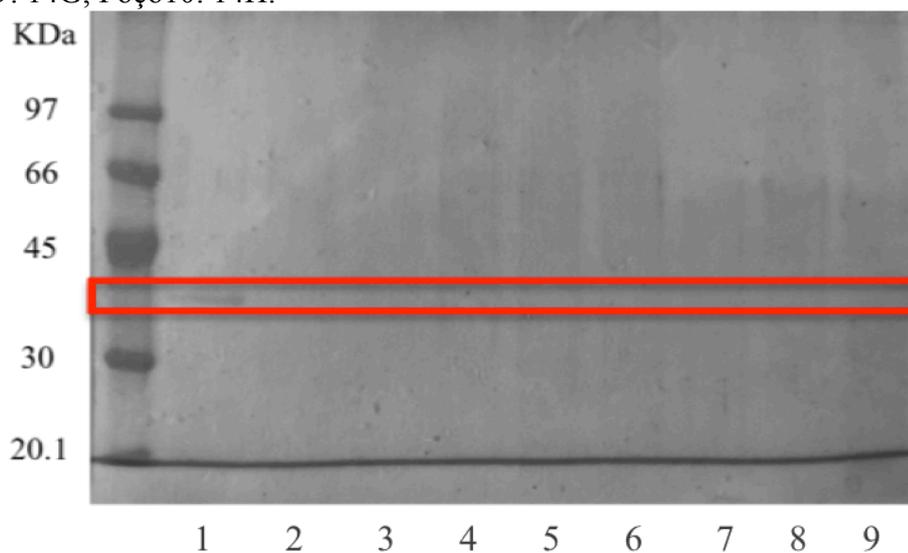
Figura 6 - Eletroforese da lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana ativada com divinilssulfona a pH 12.5. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: extrato enzimático; Poço 3: 12.5A; Poço 4: 12.5B; Poço 5: 12.5C; Poço 6: 12.5D; Poço 7: D12.5E; Poço 8: 12.5F; Poço 9: 12.5G; Poço 10: 12.5H.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A eletroforese dos derivados obtidos a partir da imobilização da enzima CALB no suporte quitosana ativado com divinilssulfona em solução a pH 14 é mostrada na Figura 7.

Figura 7 - Eletroforese da lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana ativada com divinilssulfona a pH 14. Poço 1: marcador de peso molecular; Poço 2: extrato enzimático; Poço 3: 14A; Poço 4: 14B; Poço 5: 14C; Poço 6: 14D; Poço 7: D14E; Poço 8: 14F; Poço 9: 14G; Poço 10: 14H.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez que todos os ensaios de imobilização foram conduzidos em pH 10, espera-se que a ligação da enzima com o suporte seja covalente (BARBOSA *et al.*, 2014). De fato, tal como ilustrado na Figura 5, 6 e 7 os poços que contêm enzima imobilizada não apresentam a banda da enzima. Isto indica que todos os ensaios de imobilização da CALB em quitosana ativada em diferentes condições com divinilssulfona (pH 10, pH 12,5 e pH 14) eram ligações covalentes, uma vez que, após contato com o tampão de ruptura a 100 °C, a enzima ficou mantida no suporte.

5.4 Efeito do pH na imobilização

Após definir as melhores condições de ativação e bloqueio do suporte, avaliou-se o efeito de pH durante imobilização. A Tabela 4 mostra o rendimento de imobilização (%) e a atividade do derivado (U/g) para os biocatalisadores imobilizados em tampão acetato de sódio pH 5, tampão de fosfato de sódio pH 7 e tampão de carbonato de sódio pH 10.

Tabela 4 - Resultados do rendimento de imobilização (%), atividade da enzima imobilizada (U/g) antes (Atd 1) e depois (Atd 2) da incubação em tampão de carbonato de sódio 100 mM, pH 10, e bloqueio com EDA por 24 horas a 4 °C. Imobilização foi conduzida em tampão de acetato de sódio pH 5, tampão fosfato de sódio pH 7 e tampão carbonato de sódio pH 10. Outras especificações são descritas nos métodos.

<i>pH de imobilização</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Atd 1 (U/g)</i>	<i>Atd 2 (U/g)</i>	<i>t_{1/2} (min)</i>
5	47.44 ± 0.7	1.00 ± 0.1 ^a	1.20 ± 0.0 ^a	614
7	56.70 ± 0.5	1.60 ± 0.0 ^a	1.43 ± 0.0 ^a	759
10	68.13 ± 0.5	1.84 ± 0.0 ^a	1.78 ± 0.0 ^a	> 2880

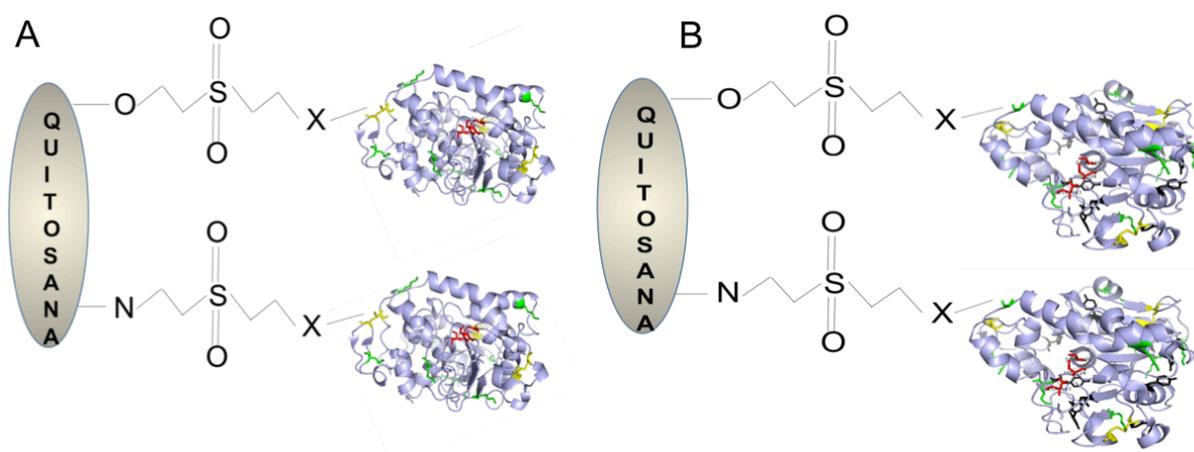
Fonte: Elaborado pelo autor. *Valores com letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

Na tabela 4 foi observado que o melhor rendimento de imobilização (%) 68,13 ± 0,46 foi obtido a pH 10 de imobilização, seguido do pH 7 e pH 5. Em relação a atividade (At_{d1} e At_{d2}), o mesmo comportamento é observado, os melhores valores foram obtidos a pH 10, seguido do pH 7 e pH 5. Quando comparadas as atividades obtidas, não se observou uma diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) antes (At_{d1}) e depois (At_{d2}) do bloqueio com EDA para os biocatalisadores obtidos a pH 5, 7 e 10. Isto deve-se às condições de reação leve utilizadas para a eliminação da reatividade química do suporte, bloqueio com EDA (DOS SANTOS *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2008b; SANTOS *et al.*, 2015a).

Na Figura 8 é mostrado a orientação hipotética da CALB em quitosana-DVS durante a imobilização a pH 5, 7 ou 10, elaborada com base na presença de resíduos de aminoácidos na CALB e sua reatividade. Foi relatado (DOS SANTOS *et al.*, 2015) que a cisteína 36 e a

histidina 10 são os resíduos mais reativos da CALB com divinilssulfona a pH 5 e pH 7. Também foi reportado que a pH 7 os grupos lisinas possuem reatividade, no entanto essa reatividade é baixa quando comparada com os grupos cisteína e histidina. Os resíduos cisteína 36, histidina e lisina 81 são os mais reativos da CALB com divinilssulfona a pH 10 (DOS SANTOS *et al.*, 2015). Na literatura é relatado que os resíduos cisteína têm maior exposição ao meio do que os resíduos de lisina, além disso a reatividade do amino terminal a pH baixo é mais significativa do que a dos grupos de lisina (BARBOSA *et al.*, 2013). Existe apenas um resíduo de histidina na sequência de aminoácidos de CALB, que é do sítio ativo. Por conseguinte, a ligação enzima/suporte ocorre através do sítio ativo da enzima, prejudicando a catálise. No entanto, apesar da elevada reatividade do resíduo de histidina, este tipo de ligação enzima/suporte através do sítio ativo é incerta devido à pequena quantidade de resíduos de histidina na estrutura de CALB. Assim, apresentou-se apenas a ligação enzima/suporte através dos resíduos de cisteína a pH 5 e pH 7 e resíduos de lisina e cisteína para os pH 10, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - (A) Representação esquemática da ligação enzima-suporte através do resíduo da cisteína a pHs 5, 7 e 10. (B) Representação esquemática da ligação enzima-suporte através do resíduo da lisina a pH 10. Sítio ativo (vermelho); Resíduos de cisteína (amarelo); Resíduos de tirosina (preto); Resíduos de lisina (verde). X pode ser os grupos amino, fenol, imidazol ou tiol das proteínas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme observado na Figura 8 a enzima tem mais resíduos reativos a pH 10 (cisteína, histidina e lisina) do que a pH 7 (cisteína e histidina). Os resultados mostraram que a enzima imobilizada teve diferentes atividades para as imobilizações realizadas a pH 7 e pH 10 ($1,43 \pm 0,0$ U/g e $1,78 \pm 0,0$ U/g, respectivamente). Este comportamento pode ser explicado pela orientação de CALB e seus resíduos reativos a esses pHs.

5.5 Hidrólise do hexanoato de etila

Os mais ativos e estáveis biocatalisadores (altos tempo de meia-vida e atividades) foram utilizados na reação de hidrólise de hexanoato de etila (HE) em diferentes pHs (5, 7 e 9,2). Os resultados de atividade (U/mg_{enzima}) para cada biocatalisador em cada condição de pH são mostrados na tabela 5.

Tabela 5 - Atividade de hidrólise do hexanoato de etila (At_{HE}) em diferentes condições de pH, catalisada por CALB imobilizada. A atividade é dada em U/mg de enzima imobilizada. Condições da reação: 30 min e 25 °C.

Derivado	At_{HE} (U/mg)		
	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.2
10C	14.52 ± 0.20	10.51 ± 0.17	12.28 ± 0.04
10D	10.12 ± 0.13	3.18 ± 0.20	2.81 ± 0.07
10H	7.68 ± 0.14	1.67 ± 0.20	3.87 ± 0.15

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os biocatalisadores 10C (entrada 3) e 10D (entrada 4) foram obtidos através da incubação em tampão a pH 10 por 24 h seguido do bloqueio com EDA por 24 h. Enquanto no biocatalisador 10C (entrada 3) a etapa de bloqueio ocorreu a 4 °C no biocatalisador 10D (entrada 4) esta etapa foi a 25 °C. O biocatalisador 10H (entrada 8) foi obtido através da incubação em tampão a pH 10 por 48 h seguido do bloqueio com EDA por 24 h a 25 °C

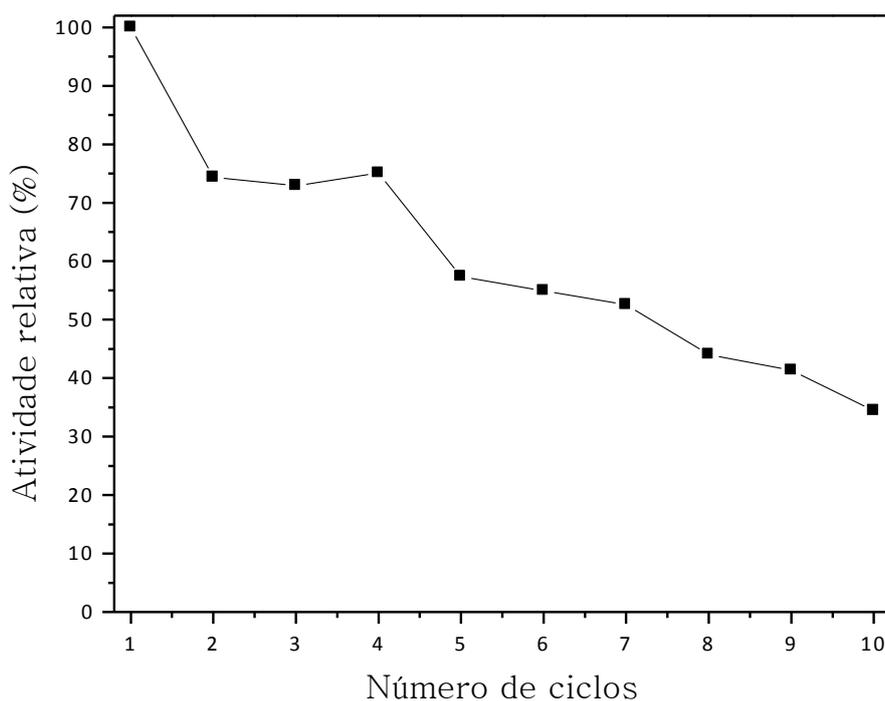
De acordo com a Tabela 5 os resultados obtidos a partir da hidrólise de hexanoato de etila foram bastante diversos. A maior atividade foi obtida em HE/pH5 ($14,52 \pm 0,20 U/mg_{enzima}$) seguida de HE/pH 9,2 ($12,28 \pm 0,04 U/mg_{enzima}$). O derivado mais ativo foi o 10C (entrada 3), em todos os diferentes ensaios testados, obtendo-se as atividades mais elevadas $14,52 \pm 0,20 U/ mg_{enzima}$, $12,28 \pm 0,04 U/ mg_{enzima}$ e $10,51 \pm 0,17 U/ mg_{enzima}$ em HE/pH5, HE/pH9,2 e HE/pH7, respectivamente. Isto ocorreu, provavelmente, devido a enzima e o substrato manter uma melhor linearização em pH 5 seguido dos pHs 9,2 e 7.

O derivado 10D (entrada 4) obteve maior atividade que o derivado 10H (entrada 8) em HE/pH5 e HE/pH7, obtendo-se $10,12 \pm 0,13 U/ mg_{enzima}$ e $3,18 \pm 0,20 U/ mg_{enzima}$, respectivamente. O derivado 10H (entrada 8) foi o menos ativo obtendo sua maior atividade de $7,68 \pm 0,14 U/ mg_{enzima}$ em HE/pH5.

A CALB imobilizada utilizando diferentes protocolos em suportes ativadas com DVS mostrou uma resposta diferente às mudanças nas condições de pH da reação o que sugere que as diferentes preparações têm diferentes orientações e/ou diferentes graus de interação da enzima/suporte (SANTOS *et al.*, 2015e).

A estabilidade operacional do biocatalisador 10C (entrada 3), que obteve os melhores resultados, foi realizada em substrato hexanoato de etila pH 5,0 e os resultados encontram-se na Figura 9.

Figura 9 - Dados de estabilidade operacional do biocatalisador 10 C na catálise da reação de hidrólise do hexanoato de etila (A_{tHE}) pH 5. Condições da reação: 30 min e 25 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se pela figura 9 que a estabilidade operacional do biocatalisador 10 C na catálise da reação de hidrólise do hexanoato de etila apresentou bons resultados, uma vez que no sétimo reciclo manteve 52% de sua atividade inicial.

6 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a imobilização de CALB na quitosana ativada com divinilssulfona é promissora. A imobilização realizada com quitosana ativada com divinilssulfona a pH 12.5 mostrou parâmetros de imobilização mais relevantes do que o realizado nos suporte ativados a pH 10 e 14, obtendo atividade do derivado (U / g) de $2,87 \pm 0,03$. No entanto, os melhores tempos de meia vida foram obtidos para os biocatalisadores preparados com quitosana ativada a pH 10. Os biocatalisadores 10C e 10D não atingiram o tempo de meia-vida a 60 °C após 48 e 24 horas, sendo assim mais de 960 vezes e 480 vezes mais estável do que a enzima livre, respectivamente.

A aplicação na hidrólise de hexanoato de etila mostrou que o derivado 10C obtém melhores resultados de atividade em relação aos derivados 10D e 10H. A atividade mais elevada foi obtida com hexanoato de etila a pH 5 obtendo-se $14,52 \pm 0,20$ U/mg_{enzima}, seguindo-se pH 7 e 9.2 obtendo-se $10,51 \pm 0,17$ U/mg_{enzima} e $12,28 \pm 0,04$ U/mg_{enzima}, respectivamente. Estes resultados mostram que o melhor derivado estudado deste trabalho foi o 10C devido ao seu tempo de meia-vida elevado e sua alta atividade em hidrólise do hexanoato de etila tanto a pH 5, 7 e 9.2.

Esta nova estratégia para obter um novo biocatalisador a partir de uma matrizes poliméricas renováveis pode ser considerada ambientalmente benigna, estável, reutilizável, além de ser utilizado em reações de interesse industrial. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a quitosana ativada com divinilssulfona constitui um suporte novo, estável e muito promissor para a imobilização de lipases.

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–36, 2013.

ADRIANO, W. S. *et al.* Adsorption of amoxicillin on chitosan beads: Kinetics, equilibrium and validation of finite bath models. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. 132–137, 2005.

ADRIANO, W. S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 2008. 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.

ADRIANO, W. S. *et al.* Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170–2179. 2008.

ALBUQUERQUE, T. L. D. *et al.* Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 865–874, 2016.

BARBOSA, O. *et al.* Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2,3,4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine. Advantages of using adsorbed lipases on hydrophobic supports. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 867–876, 2012.

BARBOSA, O. *et al.* Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 2013.

BARBOSA, O. *et al.* Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583–1600, 2014.

BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BETANCOR, L. *et al.* Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 877–882. 2006.

BEZERRA, C. S. **Imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes suportes e protocolos de ativação**. 2012. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2012.

BEZERRA, C. S. *et al.* Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. n/a-n/a, 10 jul. 2015.

BRADFORD, M. 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, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.

CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387–394, 2003.

MATEO, C. *et al.* Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. **Biotechnol**, v. 18, p. 629–634, 2002.

CHERUKUVADA, S. L. *et al.* Evidence of a Double-Lid Movement in *Pseudomonas aeruginosa* Lipase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 3, p. e28, 2005.

DICOSIMO, R. *et al.* Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437, 2013.

DOS SANTOS, J. C. S. *et al.* Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Adv.**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015.

FAN, Y.; QIAN, J. Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 1–7, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546–550. 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 405–418. 2009.

GARCIA-GALAN, C. *et al.* Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014a.

GARCIA-GALAN, C. *et al.* Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 604–616, 2014b.

GONÇALVES, V. L. *et al.* Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 6–12. 2005.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 348, n. 7–8, p. 797–812. 2006.

GRAZU, V. *et al.* Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 7, p. 960–966, 2006.

GREGORIO-JAUREGUI, K. M. *et al.* One-step method for preparation of magnetic nanoparticles coated with chitosan. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd. ed. Madrid: Humana Press, 2006.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYŃSKA, D. Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 8995–9018, 2014.

HAN, S.-Y. *et al.* Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1–3, p. 168–172, 2009.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 2, p. 50–60, 1985.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011.

HILTERHAUS, L. *et al.* Practical application of different enzymes immobilized on sepabeads. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 3, p. 163–171, 2008.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019–1032, 2008.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, 2002.

KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v. 93, n. C, p. 1–25, 1979.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2, p. 126–139, 2004.

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

LERESCHE, J. E.; MEYER, H. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, n. 3, p. 572–580, 2006.

LI, N.; BAI, R. A Novel Amine-Shielded Surface Cross-Linking of Chitosan Hydrogel Beads for Enhanced Metal Adsorption Performance. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 17, p. 6692–6700, 2005.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–49, 2013.

LÓPEZ-GALLEGO, F. *et al.* Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2005.

LOPEZ-JARAMILLO, F. J. *et al.* Vinyl sulfone functionalization: A feasible approach for the study of the lectin-carbohydrate interactions. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 846–855, 2012.

MANRICH, A. *et al.* Immobilization and Stabilization of Xylanase by Multipoint Covalent Attachment on Agarose and on Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 455–467, 2010.

MANZO, R. M. *et al.* Chemical improvement of chitosan-modified beads for the immobilization of *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 l-arabinose isomerase through multipoint covalent attachment approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 10, p. 1325–1340, 2015.

MATEO, C. *et al.* Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–745, 2000.

MATEO, C. *et al.* Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 629–634, 2002.

MATEO, C. *et al.* Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 4, p. 456–462, 2005.

MATEO, C. *et al.* Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009.

MENDES, A. A. *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MONTEIRO, O. A. .; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 2–3, p. 119–128, 1999.

MORALES-SANFRUTOS, J. *et al.* Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 8, n. 3, p. 667–675, 2010.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009.

NETA, N. DO A. S. *et al.* Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 324–331, 2012.

NICOLETTI, G. **Imobilização de lipase B de candida antarctica em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranyl propionato**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2014.

ORTEGA-MUÑOZ, M. *et al.* Vinyl sulfone functionalized silica: a “ready to use” pre-activated material for immobilization of biomolecules. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 34, p. 7189, 2010.

PALOMO, J. M. *et al.* General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2003.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, n. 1–2, p. 153–166, 2003.

PETKAR, M. *et al.* Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1–4, p. 83–90, 2006.

POPPE, J. K. **Síntese de ésteres metílicos catalisada por Lipase B de Candida antarctica imobilizada em suportes hidrofóbicos**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto alegre. 2012.

RABBANI, G. *et al.* Impact of structural stability of cold adapted Candida antarctica lipase B (CaLB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation. **RSC Adv.**, v. 5, n. 26, p. 20115–20131, 2015.

RAMYA, R.; SUDHA, P. N.; MAHALAKSHMI, J. Preparation and characterization of chitosan binary blend. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 10, p. 1–9, 2012.

RIOS, N. S. **Estudo de imobilização da lipase do tipo B de Candida antarctica em silicato mesoporoso nanoestruturado (SBA-15) visando a aplicação em reações de elevado interesse industrial**. 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2016.

RODRIGUES, D. S. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* Lipase Type B by Adsorption on Activated Carbon. **Chem. Biochem. Eng.**, v. 22, p. 125–133, 2008a.

RODRIGUES, D. S. *et al.* Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, abr. 2008b.

RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2216–2238, 2011.

RUEDA, N. *et al.* Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, 2016a.

RUEDA, N. *et al.* Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v. 259, p. 107–118, 2016b.

SANTOS, J. C. S. *et al.* Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015a.

SANTOS, J. C. S. **Otimização de biocatalisadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas.** 2015. 333 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2015.

SANTOS, J. C. S. DOS. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos.** 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2011.

SANTOS, J. C. S. DOS. *et al.* Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 117, p. 38–44, 2015b.

SANTOS, J. C. S. DOS. *et al.* Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Adv.**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015c.

SANTOS, J. C. S. DOS. *et al.* Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 17 ago. 2015d.

SANTOS, J. C. S. DOS. *et al.* Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 77, p. 1–7, set. 2015e.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases : Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 42, p. 6223–6235, 2013a.

SILVA, A. L. P. **Preparação de sílicas organofuncionalizadas para a imobilização de lipase de Burkholderia cepacia**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2012.

SILVA, J. A. *et al.* Use of neural networks in the mathematical modelling of the enzymic synthesis of amoxicillin catalysed by penicillin G acylase immobilized in chitosan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1761–1767. 2008.

SILVA, J. A. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16–24, 2012.

SIMPKINS, N. S. The chemistry of vinyl sulphones. **Tetrahedron**, v. 46, n. 20, p. 6951–6984, 1990.

SINGH, R. K. *et al.* From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1232–1277, 2013.

SOUZA, T. C. DE. *et al.* Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 58–69. 2016.

SUESCUN, A. *et al.* Immobilization of lipases on glyoxyl–octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1211–1217, 2015.

UPPENBERG, J. *et al.* 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.

VERDASCO-MARTÍN, C. M. *et al.* Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 75–86, 2016.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38. 1997.

ZHANG, C. *et al.* Novel Chitosan-Derived Nanomaterials and Their Micelle-Forming Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8409–8416. 2006.

ZHOU, H.; YU, W.; GUO, X.. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Glycidol–Chitosan–Deoxycholic Acid Nanoparticles as a Drug Carrier for Doxorubicin. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3480–3486. 2010.

