



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

PAULA JÉSSYCA MORAIS LIMA

**PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES HETEROGÊNEOS ATRAVÉS DA
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* EM SBA-15 COM
POROS EXPANDIDOS**

FORTALEZA

2024

PAULA JÉSSYCA MORAIS LIMA

PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES HETEROGÊNEOS ATRAVÉS DA
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* EM SBA-15 COM
POROS EXPANDIDOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

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

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Nathália Saraiva Rios.

FORTALEZA

2024

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

- L71p Lima, Paula Jéssyca Morais.
Preparação de biocatalisadores heterogêneos através da imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em SBA-15 com poros expandidos / Paula Jéssyca Morais Lima. – 2024.
97 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
Coorientação: Profª. Dra. Nathália Saraiva Rios.
1. lipase de *Thermomyces lanuginosus*. 2. biocatalisador heterogêneo. 3. SBA-15. 4. glutaraldeído. 5. crosslinking.. I. Título.

CDD 660

PAULA JÉSSYCA MORAIS LIMA

PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES HETEROGÊNEOS ATRAVÉS DA
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* EM SBA-15 COM
POROS EXPANDIDOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 03/07/2024.

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Professor Dr. Enrique Vilarrasa Garcia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ticiane Cavalcante de Souza
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Professor Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

A Deus.
Aos meus pais, Gracinha e
Pedro (*in memoriam*).
A minha filha amada,
Luiza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado meu caminho ao longo desta trajetória e por nunca ter me desamparado, me dando forças diariamente para persistir.

À minha mãe Gracinha, por ser meu porto seguro e apoio em todos os momentos e em todos os aspectos da minha vida, por sempre me ajudar a alcançar meus objetivos. Minha eterna gratidão, mainha!

Ao meu pai Pedro (*in memoriam*), que me deixou os melhores exemplos!

À minha amada filha Luiza, por ser meu combustível diário, minha coragem e pelo amor incondicional. Por mesmo com pouca idade, compreender minha distância física para completar essa etapa. Difícil descrever esse nosso amor e cumplicidade. Te amo demais, minha vida!

A toda a minha família, por todo incentivo, amor e oração, em especial à minha tia Lourdinha e ao meu irmão Pedro Júnior.

À minha orientadora Luciana Gonçalves, por ser um grande exemplo de profissional, competente e uma grande incentivadora da ciência. Pelos valiosos conhecimentos compartilhados e por todo comprometimento com a pesquisa. Agradeço por toda compreensão e orientação.

À professora Nathália Rios, por toda disponibilidade e ajuda desde que fomos colegas de laboratório, por todos os ensinamentos, contribuição e por enriquecer esse projeto.

Agradeço ao professor Enrique Vilarrasa-Garcia, por toda contribuição para construção deste trabalho.

Agradeço ao professor Enrique Rodríguez Castellón e ao Dr. Juan Antonio Cecilia, pelas análises de caracterização do suporte.

Sou grata por tantos amigos que fazem parte da minha vida e que mesmo sem saber me ajudaram em muitos momentos.

Agradeço de coração aos meus amigos do grupo GPBio, que contribuíram diariamente, sendo apoio, companhia e compartilhando experiências e conhecimentos. Obrigada por tornarem os dias de trabalho mais leves. Aos amigos com quem criei grandes laços de amizade e que sempre farão parte da minha vida, muito obrigada! Agradeço também a todos que fazem parte do grupo de pesquisa GPBio, por tornarem este um grupo tão enriquecedor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro - Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente na minha formação acadêmica.

"Faça o teu melhor, na condição que
você tem, enquanto você não tem
condições melhores para fazer melhor
ainda." (Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

As lipases desempenham um papel crucial no crescimento da indústria de bioprocessos, graças às suas versáteis aplicações na catálise de uma ampla gama de reações, como hidrólise, esterificação de óleos e gorduras, e reações de interesterificação. Essa grande versatilidade torna as lipases adequadas para serem utilizadas em diversas áreas, incluindo a de alimentos, biomedicina, cosméticos, biossensores, bebidas, detergentes, papel, couro e combustíveis. No entanto, as enzimas solúveis são instáveis em condições operacionais e difíceis de separar do meio reacional, o que pode resultar na contaminação protéica do produto final. Para superar esses desafios, nosso grupo de pesquisa tem estudado diversos sistemas de imobilização de enzimas, utilizando uma variedade de materiais como suportes. A imobilização enzimática é extremamente vantajosa, pois oferece melhor controle do processo, permitindo a reutilização, facilidade de separação do meio reacional, além de potencialmente melhorar as propriedades da enzima (estabilidade, atividade, seletividade ou especificidade) e reduzir os efeitos dos inibidores. Assim, as desvantagens do uso de enzimas na sua forma livre são superadas através da imobilização, tornando-a uma técnica valiosa para melhorar a aplicação de enzimas em nível industrial. As lipases têm uma propriedade comum: em meio homogêneo, elas têm seu centro ativo isolado do meio por uma cadeia polipeptídica chamada tampa. Em contato com superfícies hidrofóbicas, essa tampa se move e expõe o sítio ativo ao meio reacional, proporcionando a adsorção da lipase na forma aberta, de modo que pode haver o aumento da atividade enzimática após a imobilização, possibilitando um aumento na eficiência do processo. Diante disso, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) apresenta uma grande tampa e pode proporcionar as vantagens citadas acima. Sendo assim, este trabalho se propõe a estudar a produção de biocatalisadores heterogêneos, ativos e estáveis, pela imobilização da lipase TLL na sílica mesoporosa do tipo Santa Barbara Amorphous-15 (SBA-15), um suporte parcialmente hidrofóbico, com características importantes no que se refere a alta estabilidade térmica e mecânica desse material. Dessa forma, biocatalisadores heterogêneos foram preparados por meio da adsorção da TLL em SBA-15 não calcinado (biocatalisador SBANC-TLL) e calcinado (biocatalisador SBAC-TLL), utilizando fluoreto de amônio como expensor de poros para facilitar a imobilização da TLL. Com uma carga enzimática de 1 mg/g, foram alcançados elevados rendimentos de imobilização (> 90%) e atividades recuperadas

(>80% para SBANC-TLL e $\approx 70\%$ para SBAC-TLL). Ao aumentar a carga enzimática para 5 mg/g, o rendimento de imobilização do SBANC-TLL foi de $\approx 80\%$ e uma atividade recuperada de $\approx 50\%$, enquanto o SBAC-TLL teve um rendimento de $\approx 100\%$ e uma atividade recuperada de $\approx 36\%$. A reticulação com glutaraldeído (GA) foi realizada para melhorar a estabilidade (SBANC-TLL-GA e SBAC-TLL-GA). Embora o SBAC-TLL-GA tenha perdido 25% da atividade inicial após modificações com GA, exibiu a maior estabilidade térmica ($t_{1/2} = 5,7$ h a 65°C), quando comparado ao SBAC-TLL ($t_{1/2} = 12$ min) e a enzima solúvel ($t_{1/2} = 36$ min), e estabilidade operacional (reteve 100% de atividade após 5 ciclos). Os biocatalisadores SBAC-TLL e SBAC-TLL-GA apresentaram elevada estabilidade de armazenamento (4°C ; 90 dias), pois retiveram 100% da atividade inicial por 30 dias. Estes resultados destacam o potencial do SBA-15 como suporte enzimático e a eficácia do protocolo de reticulação com GA no aumento da estabilidade, com implicações para aplicações industriais nos setores alimentício, químico e farmacêutico.

Palavras-chave: lipase de *Thermomyces lanuginosus*; biocatalisador heterogêneo; SBA-15; SBA-15 não calcinado; SBA-15 calcinado; glutaraldeído; crosslinking.

ABSTRACT

Lipases play a crucial role in the growth of the bioprocess industry, thanks to their versatile applications in catalyzing a wide range of reactions, such as hydrolysis, esterification of oils and fats, and interesterification reactions. This great versatility makes lipases suitable for use in several areas, including food, biomedicine, cosmetics, biosensors, beverages, detergents, paper, leather and fuels. However, soluble enzymes are unstable under operating conditions and difficult to separate from the reaction medium, which can result in protein contamination of the final product. To overcome these challenges, our research group has studied several enzyme immobilization systems, using a variety of materials as supports. Enzyme immobilization is extremely advantageous, as it offers better process control, allowing reuse, ease of separation of the reaction medium, in addition to potentially improving the properties of the enzyme (stability, activity, selectivity or specificity) and reducing the effects of inhibitors. Thus, the disadvantages of using enzymes in their free form are overcome through immobilization, making it a valuable technique to improve the application of enzymes at an industrial level. Lipases have a common property: in a homogeneous medium, they have their active center isolated from the medium by a polypeptide chain called a lid. In contact with hydrophobic surfaces, this lid moves and exposes the active site to the reaction medium, providing adsorption of the lipase in the open form, so that there may be an increase in enzymatic activity after immobilization, enabling an increase in the efficiency of the process. Therefore, *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) has a large lid and can provide the advantages mentioned above. Therefore, this work proposes to study the production of heterogeneous, active and stable biocatalysts, by immobilizing the lipase TLL on mesoporous silica of the Santa Barbara Amorphous-15 type (SBA-15), a partially hydrophobic support, with important characteristics in terms of refers to the high thermal and mechanical stability of this material. In this way, heterogeneous biocatalysts were prepared by adsorption of TLL lipase onto uncalcined (SBAUC-TLL biocatalyst) and calcined (SBAC-TLL biocatalyst) SBA-15, using ammonium fluoride as a pore expander to facilitate TLL immobilization. At an enzyme load of 1 mg/g, high immobilization yields (>90%) and recovered activities (>80% for SBAUC-TLL and \approx 70% for SBAC-TLL) were achieved. When increasing the enzyme load to 5 mg/g, the immobilization yield of SBAUC-TLL was \approx 80% and a recovered activity of \approx 50%, while SBAC-TLL

had a yield of $\approx 100\%$ and a recovered activity of $\approx 36\%$. Crosslinking with glutaraldehyde (GA) was conducted to improve stability (SBAUC-TLL-GA and SBAC-TLL-GA). Although SBAC-TLL-GA lost 25% of initial activity after GA modifications, it exhibited the highest thermal stability ($t_{1/2} = 5.7$ h at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$), when compared to SBAC-TLL ($t_{1/2} = 12$ min) and the soluble enzyme ($t_{1/2} = 36$ min), and operational stability (retained 100% activity after 5 cycles). The SBAC-TLL and SBAC-TLL-GA biocatalysts presented high storage stability ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 90 days) since they retained 100% of initial activity for 30 days. These results highlight SBA-15's potential as an enzyme support and the protocol's efficacy in enhancing stability, with implications for industrial applications in the food, chemical, and pharmaceutical sectors.

Keywords: *Thermomyces lanuginosus* lipase; heterogeneous biocatalyst; SBA-15; uncalcined SBA-15; calcined SBA-15; glutaraldehyde; crosslinking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representações dos biocatalisadores obtidos através da imobilização da TLL em SBA-15. Suporte SBA-15 em cinza (SBANC: não calcinado; SBAC: calcinado), surfactante P123 em laranja, TLL em verde, glutaraldeído em azul.....	23
Figura 2	Representação esquemática do mecanismo de ativação interfacial da lipase, mostrando a transição da forma fechada para a forma aberta quando em contato com uma superfície hidrofóbica.....	27
Figura 3	Estrutura tridimensional da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> . A tampa está representada em amarelo e o sítio ativo em vermelho. (Código PBD: 1DT3).....	31
Figura 4	Representação esquemática das ligações químicas entre diferentes grupos funcionais da proteína, incluindo reticulação intramolecular, intermolecular e intersubunidades.....	35
Figura 5	Esquema ilustrativo do processo de formação da sílica mesoporosa SBA-15, mostrando as etapas de formação das micelas, condensação da fonte de sílica ao redor das micelas, e remoção do surfactante para revelar a estrutura porosa.....	38
Figura 6	As características do SBA-15: a) arranjo hexagonal uniformes de mesoporos cilíndricos, b) rugosidade da superfície dos poros, c) grupos silanol na superfície e d) mesoporos interconectados por microporos.....	39
Figura 7	Classificação das isotermas de adsorção de acordo com a IUPAC.....	41
Figura 8	Esquema ilustrativo do processo de síntese do SBA-15, mostrando o desenvolvimento de cada etapa.....	44
Figura 9	Suporte SBA-15 na forma de pó fino.....	44
Figura 10	Representação esquemática dos processos de imobilização, reticulação e estabilidades térmica e de estocagem.....	51
Figura 11	Representação esquemática dos processos de dessorção e estabilidade operacional.....	52

Figura 12	Isotermas de adsorção (■) e dessorção (●) de nitrogênio do SBA-15 calcinado (A) e não calcinado (B) sintetizado na presença de fluoreto de amônio.....	54
Figura 13	Distribuições de tamanho de poro utilizando o modelo NLDFT: SBA-15 calcinado (■) e não calcinado (●).....	57
Figura 14	Efeito do tempo de contato no processo de adsorção da TLL em SBA-15 (A) não calcinado e (B) calcinado. Atividade do controle (■) e a atividade do sobrenadante (●). A atividade relativa (%) foi calculada considerando a atividade inicial como 100%. Nas condições descritas na seção métodos (3.2.4): tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7,0), carga enzimática: 1 mg/g, temperatura ambiente. As linhas representam a tendência dos dados experimentais.....	58
Figura 15	Representação da estrutura monomérica tridimensional da lipase de <i>T. lanuginosus</i> (TLL) extraída do Protein Data Bank – PDB (código 1GT6). (A) Aminoácidos hidrofóbicos em azul. (B) Sítio ativo em verde e movimento da tampa, em laranja na forma fechada (1DT3) e em amarelo na forma aberta (1GT6). As imagens foram geradas pelo programa UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004).....	61
Figura 16	Estabilidade térmica da lipase de <i>T. lanuginosus</i> imobilizada e enzima solúvel em termos de atividade relativa. (A) carga enzimática 1 mg/g e (B) carga enzimática 5 mg/g. SBAC-TLL (■); SBAC-TLL-GA (●); SBANC-TLL (▲); SBANC-TLL-GA (▼); enzima solúvel (◆). O teste de estabilidade térmica foi realizado a 65 °C e pH 7,0, utilizando tampão Tris HCl (50 mM). (As linhas representam a tendência dos dados experimentais).....	65
Figura 17	Espectros de FTIR dos materiais estudados: SBANC (linha vermelha); SBAC (linha preta); SBAC-TLL (linha azul); SBAC-TLL-GA (linha roxa).....	69
Figura 18	Composição química da sílica: (A) grupo silanol geminal, (B) grupo silanol isolado ou livre, (C) grupo silanol vicinal ou em ponte e (D) grupo siloxano.....	71
Figura 19	Espectro RMN HPDEC de ²⁹ Si do SBA-15.....	72

- Figura 20 Eletroforese da lipase de *T. lanuginosus* solúvel e imobilizada antes e depois da reticulação com glutaraldeído. As amostras foram colocadas no gel na concentração de 0,5 mg/mL. 1- Marcador de baixo peso molecular (BPM); 2- TLL solúvel; 3- SBAC-TLL; 4- SBAC-TLL-GA. As preparações imobilizadas foram carregadas a 5 mg/g..... 75
- Figura 21 Estabilidade de estocagem dos biocatalisadores heterogêneos. Preto: SBAC-TLL; Vermelho: SBAC-TLL-GA. Os biocatalisadores imobilizados foram carregados a 5 mg/g. Letras diferentes representam valores que apresentam diferença significativa (nível de significância de 95%). Letras minúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL e letras maiúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL-GA..... 76
- Figura 22 Estabilidade operacional dos biocatalisadores da lipase de *T. lanuginosus* imobilizados ao longo de 5 ciclos de reutilização. Preto: SBAC-TLL; Vermelho: SBAC-TLL-GA. Os biocatalisadores imobilizados foram carregados a 5 mg/g. Letras diferentes representam valores que apresentam diferença significativa (nível de significância de 95%). Letras minúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL e letras maiúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL-GA..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades texturais do SBA-15 calcinado e não calcinado sintetizados neste trabalho, comparadas com dados da literatura.....	56
Tabela 2	Parâmetros de imobilização por adsorção física da lipase de <i>T. lanuginosus</i> em SBA-15 não calcinado e calcinado. O experimento foi conduzido em tampão fosfato de sódio 5 mM em pH 7,0 e 25 °C. Carga enzimática oferecida: 1 mg de proteína por grama de suporte. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a Seção 3.2.6.1. Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com a Seção 3.2.8.....	59
Tabela 3	Efeito do glutaraldeído nos parâmetros de imobilização da lipase de <i>T. lanuginosus</i> (TLL) em diferentes cargas enzimáticas (1 mg/g e 5 mg/g). Imobilização em SBA-15 conforme seção 3.2.4 e modificação com GA conforme metodologia seção 3.2.5. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a Seção 3.2.6.1. Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com a Seção 3.2.8.....	62
Tabela 4	Parâmetros de desativação térmica da lipase de <i>T. lanuginosus</i> imobilizada e da enzima solúvel, segundo modelo de Sadana e Henley (1987). Carga enzimática 1 mg/g e 5 mg/g. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a Seção 3.2.6.1 e os parâmetros de estabilidade térmica foram calculados de acordo com a Seção 3.2.9. O fator de estabilização (FE) é a razão entre $t_{1/2}$ da enzima imobilizada e $t_{1/2}$ da enzima livre.....	67
Tabela 5	Tabela 5 - Posição das principais vibrações de ligações químicas das amostras SBANC, SBAC, SBAC-TLL, SBAC-TLL-GA detectadas na região de 4000-400 cm^{-1}	70
Tabela 6	Efeito do surfactante Cetiltrimetilamônio 0,6% (m/v) (CTAB) na atividade da lipase solúvel de <i>T. lanuginosus</i> (expressa em U/mL) e preparações imobilizadas com carga de lipase de 5 mg/g (expressa em U/g).....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBA-15	Santa Barbara Amorphous-15
GA	Glutaraldeído
P123	Plurônico
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> -nitrofenil butirato
TEOS	Tetraetilortosilicato
PSD	Pore size distribution – Distribuição de tamanho de poros
NLDFT	Non-local density functional theory – Teoria funcional da densidade não local
TMS	Tetrametilsilano
CLEA	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPDEC	High-power decoupling– Desacoplamento de alta potência
MMO	Material mesoporoso ordenado
MCM-41	Mobil composite matter – Matéria composta móvel
GPBio	Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

NH ₄ F	Fluoreto de amônio
HCl	Ácido clorídrico
PDB	Protein Data Bank
ASB	Albumina de soro bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
BPM	Marcador de baixo peso molecular
t	Tempo (min, h)
T	Temperatura (° C)
t _{1/2}	Tempo de meia-vida
SBANC	SBA-15 não calcinado
SBANC-TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em SBA-15 não calcinado
SBANC-TLL-GA	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em SBA-15 não calcinado reticulado com glutaraldeído
SBAC	SBA-15 calcinado
SBAC-TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em SBA-15 calcinado
SBAC-TLL-GA	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em SBA-15 calcinado reticulado com glutaraldeído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Objetivos.....	23
1.1.1	<i>Objetivo geral.....</i>	23
1.1.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	Lipases.....	25
2.1.1	<i>Aplicações das lipases.....</i>	27
2.1.2	<i>Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>.....</i>	30
2.2	Imobilização das lipases.....	32
2.2.1	<i>Imobilização por adsorção.....</i>	33
2.2.2	<i>Imobilização por ligação covalente.....</i>	34
2.2.3	<i>Reticulação em imobilização enzimática.....</i>	35
2.3	Suporte Santa Barbara Amorphous - 15 (SBA-15).....	37
2.4	Isotermas de equilíbrio de adsorção.....	40
3	SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	43
3.1	Materiais.....	43
3.2	Métodos.....	43
3.2.1	Síntese do SBA-15.....	43
3.2.2	Caracterização do suporte e dos biocatalisadores.....	45
3.2.2.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..</i>	45
3.2.2.2	<i>Determinação das propriedades texturais do SBA-15.....</i>	45
3.2.2.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i>	47
3.2.3	Representação estrutural da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i>.....	47
3.2.4	Imobilização da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> no SBA-15.....	47
3.2.5	Reticulação dos biocatalisadores heterogêneos com glutaraldeído.....	47
3.2.6	Determinação da atividade enzimática.....	48
3.2.6.1	Hidrólise do <i>p</i>NPB.....	48
3.2.6.2	Hidrólise da triacetina.....	48
3.2.7	Concentração de proteína.....	49
3.2.8	Parâmetros de imobilização.....	49
3.2.9	Estabilidade Térmica.....	50

3.2.10	Ensaio de dessorção dos biocatalisadores com CTAB.....	51
3.2.11	Ensaio de estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados.....	51
3.2.12	Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE).....	52
3.2.13	Análise estatística.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Caracterização do SBA-15.....	53
4.2	Influência do tempo de contato na adsorção da TLL em SBA-15 não calcinado e calcinado.....	57
4.3	Biocatalisadores heterogêneos reticulados com glutaraldeído.....	62
4.4	Estabilidade térmica dos biocatalisadores.....	64
4.5	Caracterização do SBA-15 antes e depois da adsorção da lipase.....	67
4.6	Dessorção dos biocatalisadores imobilizados com surfactante CTAB.....	72
4.7	Eletroforese SDS-PAGE.....	74
4.8	Estabilidade de estocagem dos biocatalisadores heterogêneos.....	76
4.9	Estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados em ciclos sucessivos da hidrólise da triacetina.....	77
5	CONCLUSÕES.....	79
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as pesquisas sobre a aplicação de enzimas em diversos processos biotecnológicos de interesse industrial têm aumentado (ALMEIDA et al., 2021). Esses estudos abrangem áreas como a indústria alimentícia, para produção de sabor e fragrância em formulações de alimentos e bebidas (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; MAGHRABY et al., 2023); na indústria de biossensores, que podem ser usados para detectar poluentes ambientais como pesticidas ou para controlar a qualidade dos alimentos como a presença de triacilgliceróis (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019); para produção de biocombustíveis, como o biodiesel, uma fonte de energia renovável alternativa aos combustíveis fósseis (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019); na indústria de detergentes, para a remoção de manchas que produtos químicos comuns não conseguem remover (AN et al., 2014); no tratamento de efluentes industriais de processamento de alimentos, têxteis, papel, curtumes e indústrias automotivas (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019) entre outros. As enzimas são biocatalisadores naturais, e ambientalmente sustentáveis (COSTA et al., 2023; SHELDON; WOODLEY, 2018). Dentre as enzimas, as lipases se destacam devido sua contribuição para o desenvolvimento de muitas indústrias de bioprocessos, ocupando a terceira posição entre as enzimas mais comercializadas no mundo, ficando atrás apenas das proteases e das amilases (CARVALHO et al., 2017; CAVALCANTI et al., 2022). As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) têm a função de catalisar a hidrólise de ligações ésteres e também podem ser aplicadas em uma ampla gama de reações, como esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise, entre outras (MONTEIRO et al., 2019). Essa versatilidade possibilita a aplicação de lipases em diversas áreas: alimentícia, de produtos farmacêuticos, cosmética, biomédica, biossensores, de formulações de detergentes, fabricação de papel, couro e biocombustíveis, entre outras (ALCÁNTARA et al., 2022; ALMEIDA et al., 2021). As lipases são utilizadas na produção de emulsificantes, aromas, fragrâncias, termoplásticos e agroquímicos. Além disso, essas enzimas têm aplicações na extração de gorduras de produtos lácteos, como queijos e iogurtes, na remoção de impurezas do algodão antes de seu processamento e tingimento, na extração de gorduras e seus derivados durante a fabricação de couro. As aplicações das lipases abrangem produtos amplamente utilizados em nosso cotidiano (MAGHRABY et al., 2023).

Dentre as lipases, a lipase de *T. lanuginosus* (TLL) é uma das mais utilizadas na indústria (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; SILVA et al., 2023). A TLL é uma lipase termoestável que se destaca por sua elevada eficiência catalítica, além de apresentar enantiosseletividade e enantioespecificidade estrita. Ela pode ser utilizada em uma ampla gama de aplicações, incluindo a modificação de óleos e gorduras para a produção de alimentos mais saudáveis, a fabricação de biodiesel, o tratamento de águas residuais, entre outras (BEZERRA et al., 2020; CAVALCANTI et al., 2022; SILVA et al., 2023). A TLL possui formato quase esférico ($35 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$), com 269 aminoácidos em sua estrutura (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). O sítio ativo da TLL inclui a tríade catalítica serina-histidina-aspartato (SER146, ASP201, HIS258) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Além disso, a massa molecular, a faixa ótima de temperatura e o ponto isoelétrico da TLL são 31,7 kDa, 55-60 °C e 4,4, respectivamente (CAVALCANTI et al., 2022; SILVA et al., 2023). No entanto, esta enzima solúvel é instável em condições operacionais e difícil de recuperar e reutilizar. Nesse sentido, processos de imobilização estão sendo desenvolvidos para superar essas dificuldades (DA ROCHA et al., 2022a; SILVA et al., 2023).

Se bem planejadas e executadas, as estratégias de imobilização podem melhorar propriedades enzimáticas importantes, como estabilidade, seletividade, atividade, especificidade, pureza e resistência a inibidores (DA ROCHA et al., 2022b). Além disso, enzimas imobilizadas podem ser utilizadas em diversos projetos de reatores e em processos contínuos, tornando o processo economicamente viável (BASSO; SERBAN, 2019). Por outro lado, a imobilização também apresenta muitos desafios, uma vez que a enzima deve estar suficientemente ativa e estável após a imobilização para ser reutilizada. Portanto, a estratégia de imobilização deve ser bem desenhada, considerando a enzima, o suporte, as condições de imobilização e a reação de aplicação do biocatalisador após a imobilização, para minimizar alguns problemas; o mais frequente é uma diminuição na atividade enzimática.

Estudos recentes têm apontado a inativação de enzimas durante a imobilização devido à interação com regiões desnaturantes do suporte, os chamados “hotspots”, causados por grupos químicos na superfície do material (CHAPARRO et al., 2021). Além disso, outros fatores podem diminuir a atividade enzimática durante e/ou após a imobilização, como a desativação de lipases solúveis devido às condições operacionais de imobilização (principalmente se a imobilização for realizada em $\text{pH} > 9,0$) (GODOY,

2017), problemas de difusão (DOS SANTOS et al., 2022), aumento da rigidez enzimática devido à imobilização covalente multipontual (esta última frequentemente pode aumentar a estabilidade enzimática) (MENDES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2021), entre outros.

Uma estratégia utilizada para imobilização enzimática é a adsorção física. Esta técnica envolve a interação direta da enzima ao suporte através de interações iônicas e hidrofóbicas, que é uma abordagem econômica e fácil de aplicar, produzindo alta atividade enzimática. Ao contrário da imobilização covalente, a adsorção física tende a preservar a estrutura 3D da enzima (DE SOUZA et al., 2020; REIS et al., 2019). Esta é uma técnica bastante flexível, e por esse motivo, muito utilizada (FUENTES et al., 2004).

As lipases possuem uma propriedade única (mecanismo de ativação interfacial) que está intimamente relacionada à ativação interfacial, que pode ser explorada para imobilizá-la por adsorção (CIPOLATTI et al., 2021). Essa ativação ocorre quando as lipases entram em contato com superfícies hidrofóbicas, como substratos ou suportes. Como resultado, a tampa que cobre o sítio ativo da lipase se move e o expõe ao meio reacional, levando à adsorção da lipase na forma aberta. Este mecanismo muitas vezes promove o aumento da atividade enzimática após a imobilização demonstrando melhorias quanto à eficiência do processo (SILVA et al., 2023). Ademais, estudos demonstraram que a forma adsorvida da lipase tende a ser relativamente estável, em comparação com outros métodos de imobilização, desde que o equilíbrio conformacional seja mantido (PALOMO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2019). Nesse contexto, a literatura reporta que a TLL possui uma grande cadeia polipeptídica que cobre o sítio ativo da enzima (SILVA et al., 2023). Os aminoácidos referentes a esta tampa móvel são de 86 a 93 na estrutura primária da lipase (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; SILVA et al., 2023). Portanto, é possível proporcionar um aumento significativo na atividade enzimática e na estabilidade após a imobilização, movendo esta grande tampa da TLL quando em contato com suportes hidrofóbicos.

No entanto, a principal desvantagem da imobilização por adsorção física é a liberação da enzima do suporte devido à interação intrinsecamente fraca (RAFIEE; REZAEE, 2021). No caso da imobilização em suportes hidrofóbicos, a dessorção da enzima pode ocorrer durante a operação, principalmente devido à presença de compostos de natureza detergente no meio reacional (RIOS et al., 2019a). Para solucionar esse problema e manter as vantagens dessa estratégia de imobilização, a modificação química

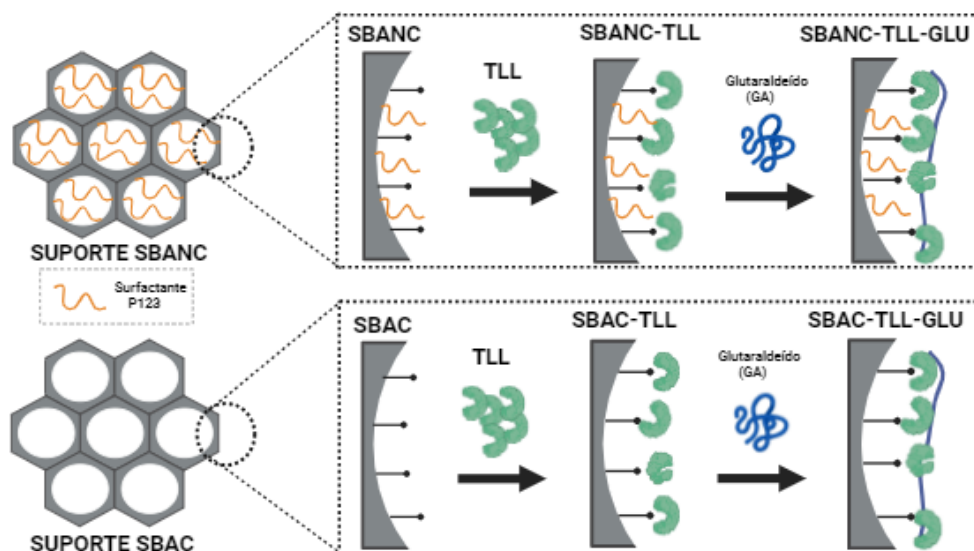
após a imobilização é uma opção a ser utilizada (RIOS et al., 2019b; SILVA et al., 2023). O glutaraldeído (GA) é um reagente químico capaz de modificar quimicamente os grupos amino da enzima, produzindo ligações covalentes e dificultando a dessorção da enzima do suporte (PINHEIRO et al., 2023; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; RUEDA et al., 2016; SILVA et al., 2023).

Diferentes suportes podem ser utilizados no processo de adsorção de enzimas. Dentre eles, o SBA-15 é uma sílica mesoporosa com importantes requisitos técnicos e ambientais (RIOS et al., 2016). Adicionalmente, essa sílica mesoporosa possui estrutura inerte, atóxica e altamente biocompatível, além de possuir elevada área superficial e extenso volume de poros, que se organizam paralelamente e combinados entre micro e mesoporos (RIOS et al., 2022). Este suporte também apresenta grupos químicos (OH) em sua superfície que proporcionam interações com as enzimas. A possibilidade de ajustar as propriedades do SBA-15 durante a síntese foi utilizada neste trabalho com a adição de fluoreto de amônio, produzindo um suporte à base de sílica com poros expandidos e canais mais curtos para facilitar a imobilização da TLL dentro dos poros do SBA-15.

Assim, embora a imobilização enzimática esteja em desenvolvimento desde 1960, ainda há muito a ser explorado e melhorado nos protocolos de produção de biocatalisadores industriais (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa (GPBio - Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológico) desenvolveu estudos utilizando SBA-15 como suporte para a imobilização da lipase B recombinante de *Candida antarctica* e lipase de *Yarrowia lipolytica*, obtendo resultados significativos (CIPOLATTI et al., 2021; RIOS et al., 2016, 2018, 2022). Como o SBA-15 tem se mostrado promissor para imobilização enzimática, este trabalho tem como objetivo estudar a imobilização da lipase de *T. lanuginosus* (TLL) neste suporte. A Figura 1 mostra uma representação esquemática do processo de imobilização que será abordado neste estudo. Neste sentido, é importante ressaltar que esta abordagem que inclui a comparação detalhada do suporte SBA-15 não calcinado (SBANC) e calcinado (SBAC) no processo de imobilização ainda não foi relatada na literatura. A Figura 1 também demonstra a presença do plurônico P123 no material não calcinado. Este agente de natureza surfactante não iônica será utilizado neste trabalho na síntese do SBA-15, atuando como um molde direcionador de estrutura, promovendo a formação de canais bem definidos e poros ordenados no material (MAGNER, 2013). Sua remoção total ocorre após a etapa de lavagem e calcinação, nas

condições apresentadas na seção métodos, e esses canais e poros permanecem estruturados.

Figura 1 - Representações dos biocatalisadores obtidos através da imobilização da TLL em SBA-15. Suporte SBA-15 em cinza (SBANC: não calcinado; SBAC: calcinado), surfactante P123 em laranja, TLL em verde, glutaraldeído em azul.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho avaliou a produção de biocatalisadores heterogêneos, ativos e estáveis, pela imobilização da lipase *T. lanuginosus* (TLL) na sílica mesoporosa do tipo Santa Barbara Amorphous-15 (SBA-15) na forma não calcinada e calcinada.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o suporte SBA-15, com adição de fluoreto de amônio, possibilitando imobilizar a lipase TLL dentro do poro;
- Caracterizar o suporte por técnicas químicas e físicas (isotermas de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN)) antes e após calcinação;

- Avaliar a imobilização da TLL por adsorção no SBA-15 calcinado e não calcinado, estudando o tempo de contato enzima-suporte;
- Caracterizar os biocatalisadores obtidos quanto à atividade e estabilidade térmica; bem como avaliar o FTIR e RMN;
- Avaliar o efeito da reticulação dos biocatalisadores heterogêneos com glutaraldeído (GA) na atividade, estabilidade térmica, operacional e de estocagem dos biocatalisadores imobilizados;
- Verificar a desorção enzimática utilizando o surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB);
- Aplicar os biocatalisadores heterogêneos em ciclos de reações modelo de hidrólise.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipases

As enzimas apresentam grande potencial como biocatalisadores na área industrial (LIMA et al., 2022). Atualmente, são bastante comercializadas e aplicadas em diversos processos de interesse biotecnológico (CAVALCANTI et al., 2022). De acordo com Almeida e colaboradores (2021), o mercado de enzimas, avaliado em 2019 em US\$ 9,9 bilhões, tende a crescer anualmente 7,1% de 2020 a 2027. Tal valorização está relacionada ao fato de os biocatalisadores enzimáticos apresentarem alta atividade e estabilidade em uma ampla gama de meios de reação, alta seletividade, regioespecificidade, estereoespecificidade e não toxicidade, além de poderem operar em condições amenas de temperatura e pH em comparação com catalisadores químicos (ALMEIDA et al., 2021; ARANA-PEÑA et al., 2020b).

Além disso, a transição para a biocatálise em detrimento da catálise química convencional é um aspecto importante a ser considerado (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Dessa forma, considerando o tipo de catalisador utilizado, as enzimas são obtidas de fontes renováveis de fácil acesso, são biodegradáveis e, geralmente, seu uso evita a necessidade de metais tóxicos e caros, além de utilizar rotas sintéticas mais econômicas, gerando também menos resíduos do que os processos convencionais (ARANA-PEÑA et al., 2020b; SHELDON; WOODLEY, 2018). Dessa forma, o uso de enzimas como biocatalisadores industriais é uma alternativa promissora comparada à química industrial convencional (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; GUO et al., 2018).

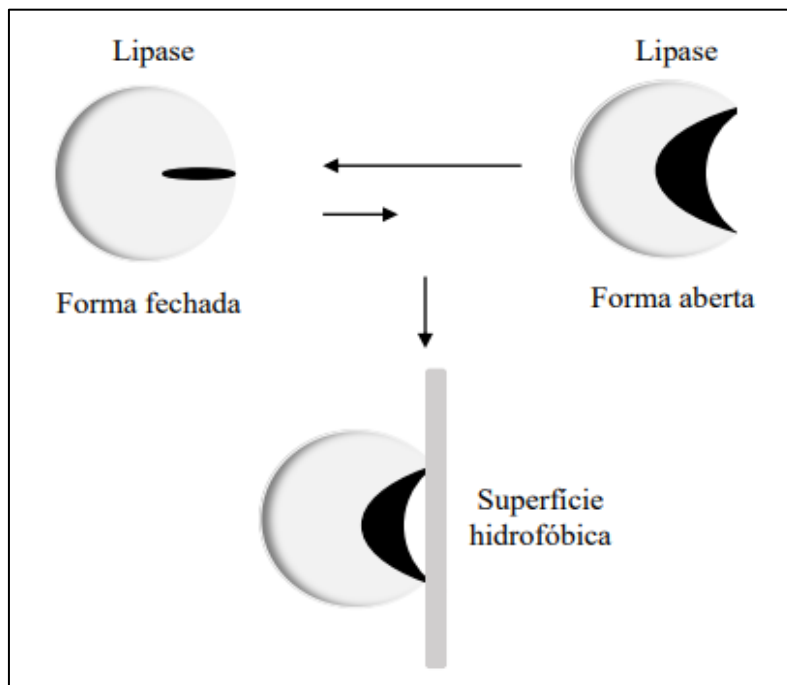
Entre as enzimas mais utilizadas, as lipases ganharam uma importante predominância, de modo que representam a terceira classe de enzimas mais vendida no mundo (CAVALCANTI et al., 2022); sendo talvez o exemplo mais estudado de enzimas com aplicação em bioprocessos (ALMEIDA et al., 2021).

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3-IUPAC) pertencem à classe da serina hidrolase da superfamília α/β -hidrolase cuja função biológica consiste em catalisar a hidrólise de óleos e gorduras (DE OLIVEIRA et al., 2018; MONTEIRO et al., 2019); e contêm a tríade de aminoácidos característica de serina, histidina e aspartato no sítio ativo (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010)

Também é importante ressaltar que as lipases apresentam um mecanismo catalítico conhecido como ativação interfacial, atuando na superfície de óleos e gorduras, de modo que essas enzimas são normalmente encontradas em sua forma fechada, com o sítio ativo recoberto por uma cadeia proteica conhecida como “tampa”, que isola o centro ativo do meio. Essa tampa é aberta ou movida para expor o sítio ativo, tornando-o fortemente adsorvido quando a lipase entra em contato com uma superfície hidrofóbica, facilitando a interação com o substrato (BROCCA et al., 2003; HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; YAACOB et al., 2016), como observado na Figura 2.

Esse mecanismo pode aumentar a atividade das lipases, uma vez que se trata da forma ativa da enzima. No entanto, a lipase permanece preferencialmente na forma fechada em meio homogêneo salino, visto que a bolsa hidrofóbica é instável nessas condições, mas a forma fechada está em equilíbrio com a forma aberta da lipase (ALMEIDA et al., 2021). O movimento da tampa, durante a catálise, reflete em mudanças em toda a estrutura da enzima. A flexibilidade do sítio ativo das lipases as torna extremamente sensíveis a qualquer mudança nas condições experimentais, permitindo modificar consideravelmente suas propriedades sem prejudicar sua atividade (MATEO et al., 2007).

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de ativação interfacial da lipase, mostrando a transição da forma fechada para a forma aberta quando em contato com uma superfície hidrofóbica.



Fonte: Silva (2023).

As lipases podem catalisar uma ampla gama de reações, embora sejam mais comumente usadas para hidrólise e esterificação de óleos e gorduras, também catalisam reações de interesterificação, transesterificação, alcoólise, acidólise, aminólise e epoxidações (DE OLIVEIRA et al., 2018; ZHANG et al., 2013). A grande versatilidade das lipases as torna adequadas para diversas aplicações, em diversas áreas, como alimentos, biomédico, cosmético, biossensor, bebidas, biodegradação, química, polímero, detergente, papel, couro e combustíveis, além de serem usadas na produção de biodiesel, ésteres de sabor e lipídios estruturados, entre outros (ALMEIDA et al., 2021).

2.1.1 Aplicações das lipases

As lipases contribuem extensivamente para o crescimento da indústria de bioprocessos, devido às suas versáteis aplicações na catalisação de ampla gama de reações envolvidas, principalmente no bioprocessamento de matérias-primas ou na síntese de produtos químicos orgânicos (MALDONADO; MACEDO; RODRIGUES, 2014). Este bioprocessamento funciona sob condições brandas e permite o uso de matérias-primas contendo grandes quantidades de ácidos graxos livres (ATADASHI et al., 2013).

As lipases estão entre as enzimas mais úteis e são amplamente utilizadas em numerosos processos biossintéticos industriais, como mencionado anteriormente. Nas indústrias de alimentos e laticínios, as lipases de fungos têm sido usadas com sucesso como catalisadores para liberar ácidos graxos em produtos alimentícios pela hidrólise seletiva e interesterificação de gorduras e óleos (SARMAH et al., 2018). Além disso, as lipases são desejáveis para a produção de sabores em queijo, para acelerar a lipólise da manteiga, gorduras e cremes (SAE-LEAW; BENJAKUL, 2018), bem como para para modificação e decomposição de biomateriais complexos e, para facilitar a remoção de gordura da carne e dos produtos da pesca (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007). As lipases são usadas também para melhorar o teor de sabor dos produtos de padaria, liberando ácidos graxos de cadeia curta através de esterificação e, para prolongar a vida de prateleira dos produtos de panificação (ADRIO; DEMAÏN, 2014). Também apresentam aplicações extensivas na indústria de laticínios, pois desempenham um papel importante na catálise da hidrólise da gordura do leite, síntese de vinhos, alimentos cozidos, emulsificantes, suplementos e produtos lácteos (TAMBE et al., 2015).

O uso de enzimas em formulações de detergentes também é bastante comum atualmente. Muitos produtos detergentes para lavagem de roupas contêm coquetéis de enzimas, incluindo as lipases, devido à sua capacidade de hidrolisar as gorduras (SHARMA; SHARMA; SHUKLA, 2011).

Na indústria têxtil as lipases são amplamente utilizadas para melhorar o processamento auxiliando na remoção de lubrificantes, produzindo tecidos mais absorventes e reduzindo a frequência de estrias e rachaduras em tecidos, como o denim (ROWE, 1999).

O nível de lipases no soro sangüíneo pode ser usado como uma ferramenta diagnóstica para detectar condições como pancreatite aguda e lesão pancreática (HOFMEYER; MEYER; WARREN, 2014). As lipases desempenham um papel importante na modificação de monoglicerídeos para uso em emulsificantes em aplicações farmacêuticas (SARMAH et al., 2018).

O biodiesel pode ser sintetizado por abordagens quimio-catalíticas, termocatalíticas e biocatalíticas, nas quais o último emprega lipases como biocatalisadores e a reação de transesterificação catalisada por lipase tem lugar entre um lípido e um álcool de cadeia curta para produzir um éster de glicerol. Também podem ser

utilizadas como biocatalisadores para a conversão do glicerol residual da indústria do biodiesel em lipídios estruturados como os monoacilgliceróis e diacilgliceróis de alto valor agregado, através de sua glicerólise enzimática (VALÉRIO et al., 2010). O glicerol é uma matéria-prima renovável, versátil, que pode ser aplicado usada principalmente na indústria química, como umectante em doces, bolos, carnes e queijos, e também como solvente, adoçante e conservante em bebidas e alimentos, dando sabor e cor a alimentos e refrigerantes (MONTEIRO et al., 2018).

As lipases apresentam um amplo potencial de aplicação na indústria de cosméticos e perfumaria, demonstrando atividades significativas em surfactantes e na síntese de aromas. A produção de diversos surfactantes, incluindo aqueles baseados em monoacilgliceróis e diacilgliceróis, é realizada por meio da transesterificação catalisada por lipase e pela resolução de intermediários racêmicos (BRABCOVÁ et al., 2013). Destaca-se, neste contexto, a aplicação das lipases na produção de ésteres aromáticos, como o butirato de metila e o butirato de etila, amplamente utilizados na indústria para criar fragrâncias de maçã e abacaxi, respectivamente. O processo enzimático permite a síntese de ésteres enantiomericamente puros em condições de temperatura amena e pH neutro, resultando em produtos de alta qualidade e sendo reconhecido pela indústria como um método natural.

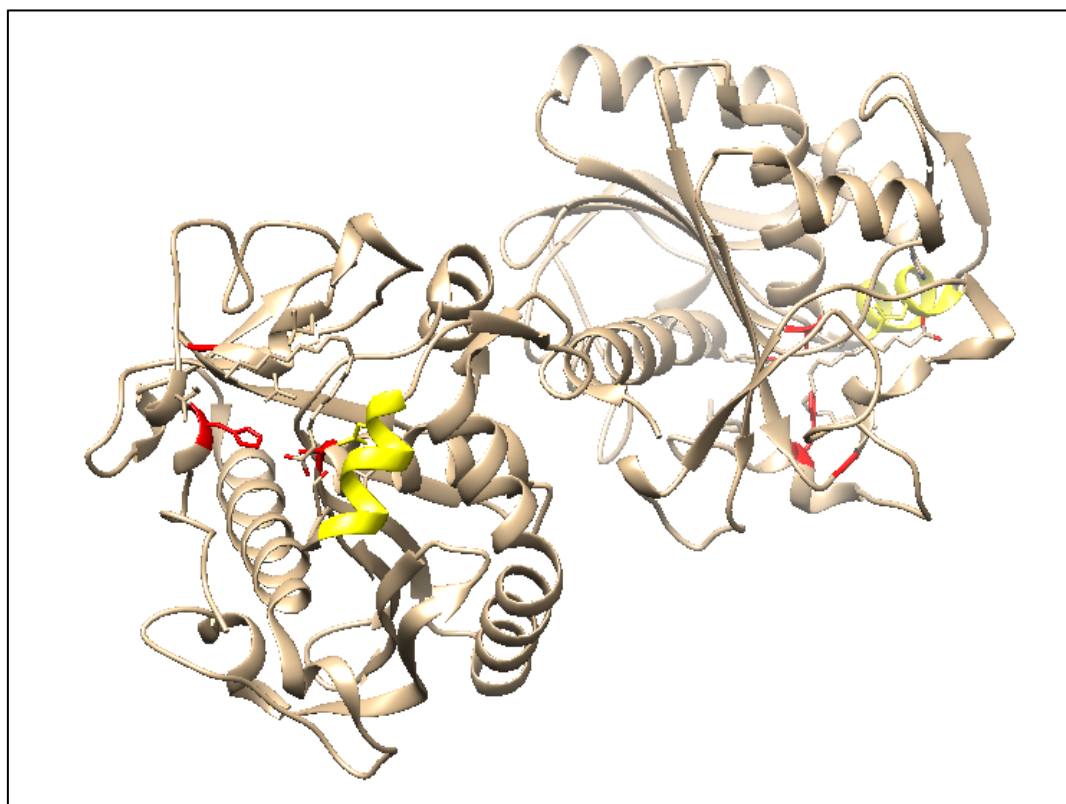
Além das aplicações citadas anteriormente, as lipases também possuem aplicações na área farmacêutica e tem comprovado extensivamente sua utilidade significativa como uma ferramenta versátil na síntese de compostos enantiomericamente puros de grande relevância, consolidando-se como as enzimas mais empregadas nos processos industriais ao longo das últimas décadas (DE MATTOS et al., 2015). Foram conduzidas pesquisas a partir da resolução cinética enzimática do indanol racêmico via acilação, empregando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em immobead-150. Além disso, alcançou-se uma N-acetilação **seletiva** do (1S, 2R) -1-amino-2-indanol por meio da lipase B de *Candida antarctica* expressa em *Aspergillus niger* imobilizada, resultando em um elevado excesso enantiomérico (SOUZA et al., 2016).

Dentre as lipases mais utilizadas e uma das mais bem estudadas, destaca-se a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), com atuação em diversos setores industriais (indústria de biodiesel, detergentes, alimentícia, farmacêutica, biolubrificantes, entre outras) (CAVALCANTI et al., 2022; SILVA et al., 2023).

2.1.2 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), anteriormente conhecida como *Humicola lanuginosa*, é derivada de um fungo termofílico frequentemente encontrado em detritos orgânicos auto aquecidos. Esse fungo demonstra um ótimo crescimento em temperaturas que atingem até 60°C, sendo incapaz de se desenvolver em condições abaixo de 20°C. Além disso, destaca-se por produzir enzimas mais termoestáveis em comparação com microrganismos mesófilos (SINGH; MADLALA; PRIOR, 2003). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é uma proteína de cadeia simples que possui um total de 269 aminoácidos, com peso molecular de 31,7 kDa e ponto isoeletrico 4,4 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Esta enzima possui uma faixa ideal de temperatura, mantendo atividade entre 55°C e 60 °C (FERNANDES et al., 2004), com o máximo de atividade em torno do pH 9 (RODRIGUES et al., 2009). Sua estrutura possui uma forma aproximadamente esférica, com tamanho de 35 Å × 45 Å × 50 Å, contendo oito fitas centrais, predominantemente folhas betas paralelas com cinco alfa-hélices interconectadas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), como mostrado na Figura 3. A enzima apresenta uma tampa móvel constituída pelos aminoácidos 86 a 93, a qual cobre o sítio ativo, incluindo um dos quatro resíduos de Trp da TLL, especificamente o resíduo Trp-89. Estudos conduzidos por Holmquist e colaboradores (1995) demonstraram a extrema importância desse resíduo, Trp-89, para assegurar uma hidrólise eficiente. O sítio ativo da TLL é composto pela tríade catalítica Ser-His-Asp, localizada nas posições 146, 258 e 201, respectivamente (HOLMQUIST et al., 1995) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, destacando a tampa em amarelo e o sítio ativo em vermelho. (Código PDB: 1DT3).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus*, assim como outras lipases, realiza a catálise por meio do mecanismo de ativação interfacial. Esta enzima é uma das lipases com maior propensão a formar agregados bimoleculares. Essa característica deve ser levada em consideração na análise das propriedades da TLL, uma vez que o monômero e o dímero exibem distintas características de seletividade, atividade e estabilidade (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

É relevante abordar o impacto dos detergentes nas características da TLL. Ao empregar detergentes, é possível estabilizar a forma aberta da lipase e desfazer as interações entre as enzimas, resultando na sua forma monomérica, considerada mais ativa, porém menos estável. Essas observações podem justificar o aumento da atividade da TLL na presença de concentrações moderadas de detergentes. No entanto, é importante salientar que, por outro lado, os detergentes também podem atuar como inibidores das lipases, levando à inativação. Além disso, têm a capacidade de modular a especificidade

dessa lipase (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007; SILVA et al., 2023). Portanto, quando utilizados adequadamente, os detergentes se mostram como uma ferramenta que pode aprimorar as funcionalidades da TLL.

Semelhante à maioria das enzimas, a TLL demanda uma imobilização prévia para ser aplicada na indústria. Portanto, o processo de imobilização dessa enzima tem sido extensivamente investigado, embora já exista uma preparação imobilizada de TLL amplamente empregada comercialmente pela empresa Novozymes, abrangendo diversas aplicações (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; PENG et al., 2002).

Apesar de a TLL já demonstrar considerável estabilidade em uma grande diversidade de meios reacionais, aprimorar ainda mais essa característica pode ser crucial para ampliar suas aplicações.

2.2 Imobilização das lipases

As lipases frequentemente requerem melhorias para serem empregadas como biocatalisadores, devido apresentarem propriedades indesejáveis em sua forma livre, como a solubilidade em água. Isso dificulta e encarece o isolamento, recuperação e purificação para uso único (GUPTA; BHATTACHARYA; MURTHY, 2013). Essas limitações das enzimas livres podem ser superadas por meio de sua imobilização, uma técnica útil para aprimorar a aplicação de enzimas em nível industrial (YÜCEL, 2012). Essa estratégia não apenas eleva a estabilidade da enzima, mas também reduz os custos do processo reacional. Adicionalmente, é possível aprimorar a estabilidade operacional da enzima, diminuir a presença de inibidores e viabilizar a reutilização do biocatalisador, facilitando a implementação de processos contínuos e a separação eficiente da lipase do meio reacional. Esses benefícios tornam o processo economicamente viável (PINHEIRO et al., 2019).

Segundo Katchalski-Katzir e Kraemer (2000), a enzima imobilizada se refere a um sistema ou preparação em que a enzima é fisicamente confinada em uma região do espaço, mantendo suas atividades catalíticas e possibilitando seu uso repetido e contínuo (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000). A ativação interfacial de lipases em superfícies hidrofóbicas tem sido empregada para a imobilização de diversas lipases, um processo que envolve a forma aberta da lipase (MANOEL et al., 2015).

Existem diferentes métodos para imobilizar lipases, sendo essencial que se baseiem em condições químicas moderadas, considerando pH, temperatura e pressão.

Além disso, a eficácia do método depende da ampla área superficial da matriz (que influencia a interação com a enzima), da estabilidade química no meio reacional e da alta carga de lipase. No contexto de aplicações industriais, é preferível uma matriz imobilizada que seja robusta tanto quimicamente quanto mecanicamente (WYSOCKI; ŁAWRYŃCZUK, 2015). O método adequado deve ter a capacidade de minimizar as barreiras para o transporte de massa de substrato e produto, sendo que a eficiência da matriz imobilizada naturalmente varia de acordo com as aplicações específicas almejadas.

Os métodos de imobilização mais utilizados são a adsorção física e a ligação covalente. Ambos serão abordados no presente estudo e comentados a seguir.

2.2.1 Imobilização por adsorção

A significativa vantagem da imobilização por adsorção está relacionada ao fato deste método ser um processo de baixo custo, quando comparado as demais técnicas de imobilização, sem a necessidade de agentes químicos para modificar o suporte e torná-lo apto para a imobilização da enzima. Esta técnica é considerada a mais simples entre todas as abordagens. Além disso, os métodos de adsorção são bastante diretos e não comprometem a atividade enzimática. A adsorção de uma enzima em um suporte pode ser feita por diferentes interações físicas, como hidrofóbica, troca iônica, ligação de hidrogênio e forças de van der Waals (ALMEIDA et al., 2021). A imobilização por adsorção pode ser reversível, o que é um ponto atrativo diante da possibilidade de reutilização do suporte (REIS et al., 2019). A imobilização por interações de troca iônica depende fortemente do pH do meio e do ponto isoelétrico da enzima. Durante a imobilização, a adsorção de uma segunda camada pode ocorrer no topo da primeira camada enzimática, resultando em construções de multicamadas (DE OLIVEIRA et al., 2021).

Uma desvantagem deste método é a fácil liberação da enzima do suporte devido a interações intrinsecamente frágeis. Contudo, imobilizações de enzimas em suportes hidrofóbicos podem estabelecer interações mais robustas, superando essa limitação (OLIVEIRA et al., 2021; REIS et al., 2019)

Em geral, este protocolo provoca pequenas alterações conformacionais na enzima devido a fraca ligação e possibilita a recuperação do suporte após a inativação de proteínas, uma vez que a enzima pode ser desorvida no final do ciclo (MATEO et al., 2007).

2.2.2 Imobilização por ligação covalente

Essa técnica é amplamente utilizada, mas sua execução pode ser desafiadora, uma vez que alguns suportes demandam alguma forma de ativação (GARCIA-GALAN et al., 2011). Além disso, a composição, o tamanho e forma do suporte, a natureza do método de acoplamento e as condições durante o acoplamento, são fatores críticos que podem impactar o processo de imobilização (RAFIEE; REZAEI, 2021).

De acordo com Rafiee e Rezaei (2021), primeiramente, os grupos funcionais das enzimas são adsorvidos e, em seguida, ligados covalentemente ao suporte, proporcionando um aumento da estabilidade e na inibição da liberação da enzima em soluções (RAFIEE; REZAEI, 2021). Biocatalisadores com atividades mais elevadas são alcançados quando o centro ativo não participa do processo de ligação ao suporte.

A formação de ligações covalentes multiponto acontece quando a enzima é unida ao suporte através de diversas cadeias covalentes. Neste caso, não é possível alterar as posições relativas deste tipo de ligação por distâncias superiores ao tamanho do braço espaçador (OLIVEIRA et al., 2021; RAFIEE; REZAEI, 2021). Essa característica torna essa técnica uma ferramenta poderosa para melhorar a rigidez enzimática e, conseqüentemente, sua estabilidade. Este método apresenta alta eficiência térmica e de estabilidade operacional, em comparação com outras técnicas. Se a ligação covalente multiponto for significativa, a estrutura da enzima se torna estável e rígida, conferindo proteção contra condições extremas de pH, temperatura e à incubação em solventes orgânicos. Dessa forma, a enzima não é desorvida do suporte (RAFIEE; REZAEI, 2021; SANTOS et al., 2015).

O processo de ligação entre a enzima e o suporte é irreversível, logo, há um rendimento de imobilização relativamente menor, quando comparada a outros métodos. Essa técnica também pode levar a perda total ou parcial da atividade catalítica devido a alterações morfológicas da proteína, induzida por múltiplos pontos de fixação entre a enzima e o suporte. Ligação covalente multiponto de enzimas pode não ser simples de alcançar, mas é uma das estratégias mais poderosas para estabilização enzimática (RODRIGUES et al., 2013).

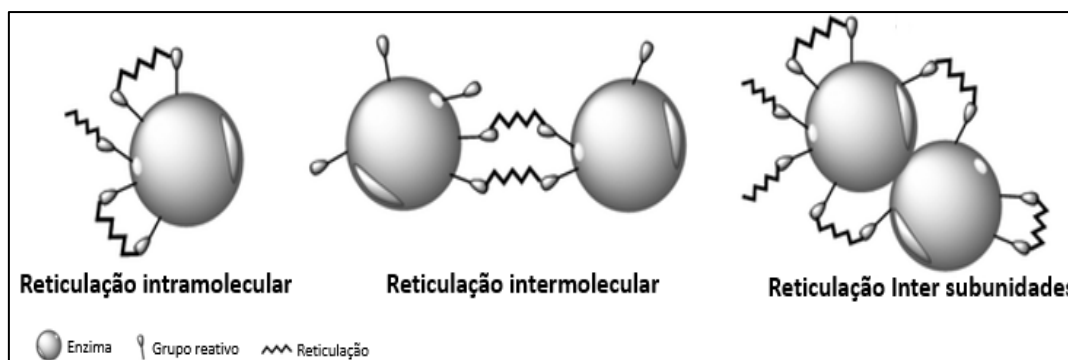
É essencial ressaltar que esse procedimento demanda a modificação química da superfície do suporte para obter grupos intermediários reativos. Essa modificação é realizada por meio de reações de ativação ou funcionalização do suporte, através do uso

de diferentes agentes: glutaraldeído, divinilsulfona, glioxil (DE OLIVEIRA et al., 2018b; DOS SANTOS et al., 2017; RIOS et al., 2016; SANTOS et al., 2015).

2.2.3 Reticulação em imobilização enzimática

A reticulação de enzimas previamente imobilizadas é uma estratégia eficaz usada para melhorar a estabilidade dos biocatalisadores imobilizados, visto que pode evitar a liberação de subunidades enzimáticas para o meio reacional (ABELLANAS-PEREZ et al., 2023a; BARBOSA et al., 2014). Para isso, os agentes de reticulação devem apresentar, preferencialmente, alta reatividade com os aminoácidos localizados na superfície da enzima (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). A reticulação química envolve uma reação que forma uma rede tridimensional entre a enzima, o suporte e um agente químico, conhecido como agente reticulador (ALAMSYAH et al., 2017). As reticulações proteicas podem ocorrer entre grupos localizados em diferentes moléculas de proteína, a chamada reticulação intermolecular, entre grupos localizados na mesma molécula, a reticulação intramolecular, ou ainda entre subunidades de enzimas multiméricas ou sistemas multienzimáticos, a chamada reticulação intersubunidades, ver Figura 4 (ABELLANAS-PEREZ et al., 2023a; BARBOSA et al., 2014; RUEDA et al., 2016).

Figura 4 – Representação esquemática das ligações químicas entre diferentes grupos funcionais da proteína, incluindo reticulação intramolecular, intermolecular e intersubunidades.



Fonte: Adaptada de Rueda et al. (2016).

O glutaraldeído é um agente reticulador frequentemente utilizado no desenvolvimento de biocatalisadores, pois apresenta várias vantagens, como, alta reatividade em diferentes partes das enzimas (grupos tióis, fenóis, imidazóis, aminas),

podendo reagir rapidamente com grupos amina em pH 7, além do seu baixo custo, disponibilidade e, por ser bastante eficiente na estabilização (DE OLIVEIRA et al., 2021). Diferentes estudos relataram tratar a enzima imobilizada com glutaraldeído (ABELLANAS-PEREZ et al., 2023b; BARBOSA et al., 2014; GAO et al., 2010; KIM et al., 2008; LEE et al., 2005; QIAN et al., 2023; SILVA et al., 2023).

Na maioria dos casos descritos na literatura, os tratamentos do biocatalisador envolvendo glutaraldeído são realizados com biocatalisadores totalmente carregados de proteínas. Nessas condições, as enzimas estão tão próximas umas das outras que a distância entre elas está dentro do alcance da reticulação do glutaraldeído. Além disso, se dois grupos reativos estiverem convenientemente posicionados, pode ocorrer reticulação intermolecular (BARBOSA et al., 2014). As modificações intramoleculares (um ponto ou reticulações) também podem ocorrer, reforçando os efeitos de estabilização em alguns casos.

Com relação à liberação das enzimas, a reticulação proporciona a formação de um grande agregado enzimático, dessa forma agora passa a ser necessário liberar simultaneamente todas as enzimas adsorvidas. A formação desse agregado enzimático faz com que a “força” da adsorção aumente exponencialmente com o tamanho do agregado. Sendo assim, sob condições onde as moléculas individuais seriam totalmente dessorvidas, agora a enzima pode permanecer totalmente adsorvida no suporte devido a formação de ligações fortes enzima-enzima (BARBOSA et al., 2014). Uma desvantagem desta estratégia seria a de transformar um método de imobilização reversível em um método irreversível, quando agregados muito grandes são formados.

Os estudos de Lee et al. (2005) e Kim et al. (2008), mostraram que lipases foram imobilizadas em sílica mesoporosa SBA-15 por reticulação de enzimas adsorvidas, resultando em agregados enzimáticos reticulados unidimensionais nos canais de poros lineares do SBA-15. Esta abordagem se apresentou muito eficaz na prevenção da dessorção enzimática e, conseqüentemente, na melhoria da estabilidade da enzima (KIM et al., 2008; LEE et al., 2005).

Em outro exemplo, Gao e colaboradores (2010), também investigaram as influências do método de reticulação na eficiência da imobilização da lipase de *Candida rugosa* em material mesoporoso SBA-15, para resolver o problema de lixiviação da enzima adsorvida, utilizando quitosana e glutaraldeído como “unidade ponte” e “agente de reticulação”, respectivamente, que realizaram a imobilização de moléculas de lipase

adsorvidas na superfície dos poros em uma camada semelhante a uma malha. As atividades da lipase imobilizada foram muito superiores às da lipase livre e permaneceram 80,5% da atividade inicial após 6 ciclos (GAO et al., 2010).

Em um trabalho mais recente, apresentado por Qian *et al.* (2023), a lipase B de *Candida antarctica* foi imobilizada em nanopartículas de sílica por adsorção física e depois reticulada com glutaraldeído para preparar lipase imobilizada reticulada. Os resultados mostraram que a combinação de adsorção física e reticulação para imobilizar a lipase é um método barato e simples que pode melhorar a atividade e estabilidade da lipase, podendo fornecer mais possibilidades para a industrialização da lipase (QIAN et al., 2023).

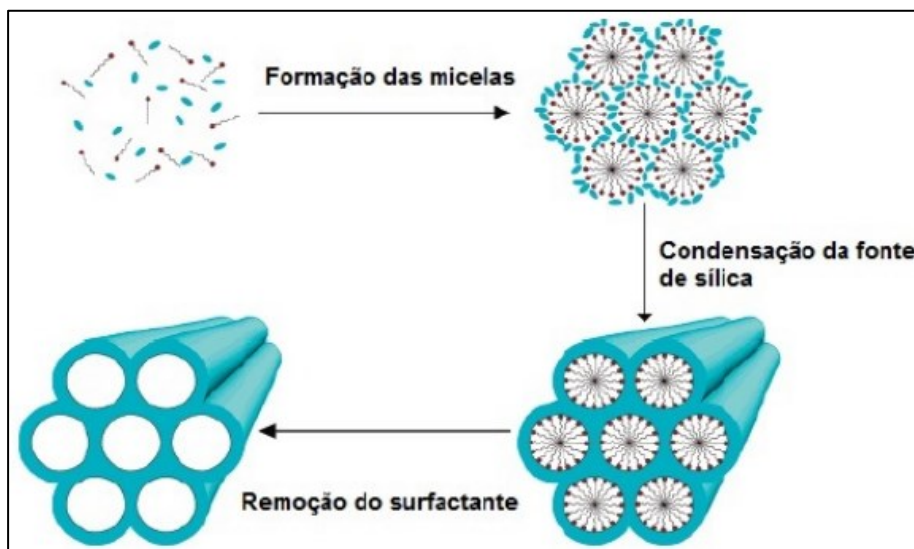
2.3 Suporte Santa Barbara Amorphous - 15 (SBA-15)

O suporte Santa Barbara Amorphous - 15 (SBA-15), material mesoporoso ordenado (MMO), apresenta várias aplicações, como suporte para preparação de biocatalisadores, como adsorventes (ZHAO et al., 1998). Este material tem como fonte precursora a sílica, consistindo em uma matriz de óxido de silício. Sua utilização ganhou grande visibilidade devido a sua estrutura hexagonal, visto que o SBA-15 contém mesoporos com arranjos hexagonais uniformes e paredes de sílica espessas que proporcionam uma alta estabilidade térmica e hidrotérmica, quando comparada a sílica mesoporosa convencional (MCM-41). Outras características desse material se referem ao tamanho do poro, com diâmetro entre 2 e 50 nm, ou seja, mesoporos de acordo com a IUPAC (SING et al., 1985); eles apresentam microporos (tamanho dos poros < 2 nm), de modo que, canais de mesoporos são interconectados através desses microporos e, além disso, possui uma significativa atividade química de superfície (VAN DER VOORT et al., 1991), função esta da concentração e distribuição de diferentes grupos silanol e siloxano, na superfície sólida (OJEDA-LÓPEZ et al., 2015; ZHURAVLEV, 2000). Os grupos silanol podem modificar a superfície do sólido para aplicações específicas, pois permitem a ligação de vários compostos químicos (CALLEJA et al., 2011).

O mecanismo de formação do SBA-15 envolve três etapas e pode ser observado na Figura 5. A primeira se refere a hidrólise-condensação de tipos de silicato (Tetraetilortosilicato - TEOS) ao redor das micelas de surfactante, o copolímero tribloco Plurônico P123 (PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀). O P123 forma cristais líquidos sob condições adequadas de temperatura acima da sua concentração micelar crítica. Em seguida, a

consolidação da matriz sólida em condições hidrotermais, visto que, a estrutura formada serve como molde para a formação do material mesoporoso, através de um tratamento com aquecimento. E, por fim, a calcinação do material para remover resíduos do surfactante, de modo que, uma estrutura mesoporosa permanece após a remoção do mesmo.

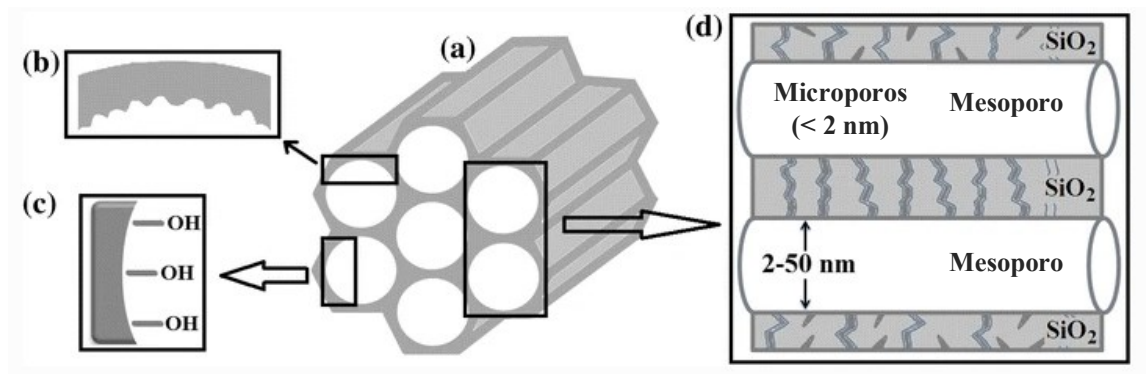
Figura 5 – Esquema ilustrativo do processo de formação da sílica mesoporosa SBA-15, mostrando as etapas de formação das micelas, condensação da fonte de sílica ao redor das micelas, e remoção do surfactante para revelar a estrutura porosa.



Fonte: Alves (2018).

Os materiais obtidos por esta via são sólidos mesoporosos com alta estabilidade térmica e mecânica, apresentam uma fácil acessibilidade à sua porosidade, bem como, grupos silanol em sua superfície (a quantidade destes está relacionada com a temperatura de calcinação) (RIOS et al., 2022). A Figura 6 apresenta as características do SBA-15.

Figura 6 - Características do SBA-15: a) arranjo hexagonal uniformes de mesoporos cilíndricos, b) rugosidade da superfície dos poros, c) grupos silanol na superfície e d) mesoporos interconectados por microporos.



Fonte: Ojeda-López et al. (2015).

O material mesoporoso ordenado (SBA-15) também oferece outros benefícios importantes a serem mencionados, como seu caráter parcialmente hidrofóbico (se comparado com outras sílicas mesoporosas), grande volume de poros, alta área superficial, canais paralelos (Santos et al., 2013), e a combinação de micro e mesoporosidade, citada anteriormente. Sua modelagem (P123) é relativamente barata, biodegradável e não tóxica em comparação com as utilizadas na preparação do MCM-41.

Para este trabalho, o SBA-15 foi sintetizado na presença de fluoreto de amônio, com o intuito de limitar o crescimento dos mesocanais, levando a formação de canais mais curtos (VILARRASA-GARCÍA et al., 2014). Esse efeito da adição do fluoreto é importante para imobilização de enzimas, em relação a diminuição dos efeitos difusionais de entrada do substrato no biocatalisador e de saída do produto. A literatura reporta que tanto a ligação da lipase, como a fácil acessibilidade às moléculas do substrato deve ser favorecida pela morfologia interna do suporte poroso, a fim de facilitar a transferência de massa (ZHANG et al., 2004). Além disso, a adição do fluoreto de amônio na síntese também proporciona um leve aumento do diâmetro dos poros do SBA-15. Entretanto, o fluoreto de amônio não funciona como um expasador de poro, este efeito é consequência da diminuição do tamanho dos mesocanais.

Devido às vantagens previamente mencionadas, materiais mesoporosos ordenados, como o SBA-15, representam matrizes atraentes para a imobilização de enzimas, dadas suas características de tamanho de poro uniforme e ajustável (GASCÓN et al., 2014). Assim, esse material tem sido amplamente empregado, viabilizando a

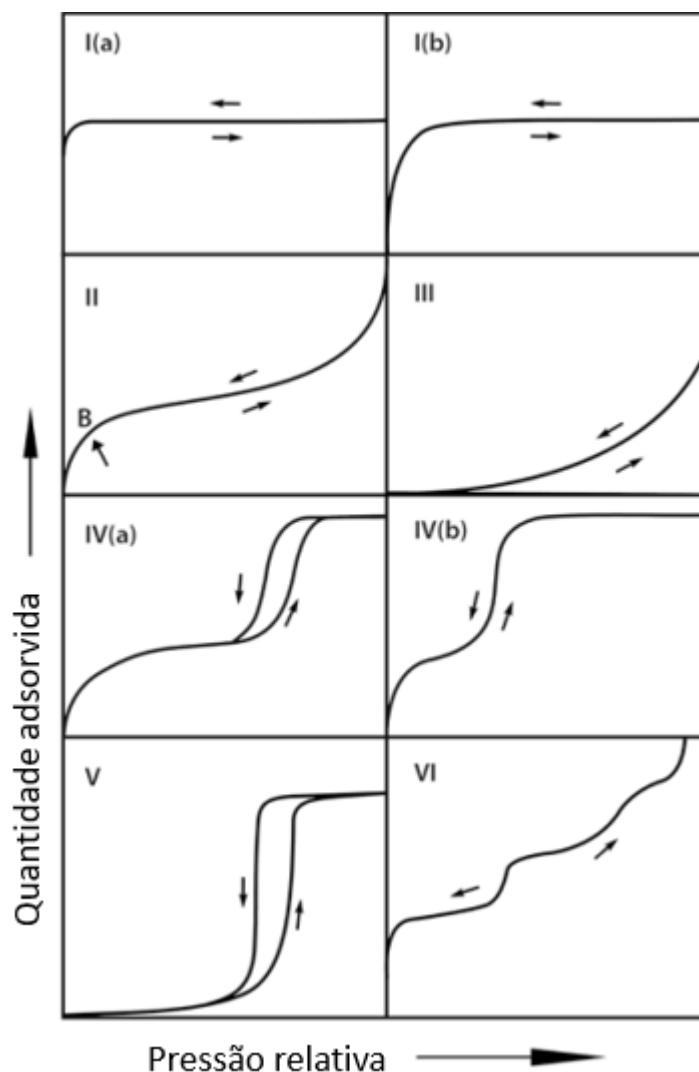
obtenção de um biocatalisador heterogêneo reutilizável (CIPOLATTI et al., 2021). Neste trabalho, o SBA-15 foi utilizado como suporte, antes e após sua calcinação.

2.4 Isotermas de equilíbrio de adsorção

Isotermas de adsorção são essenciais para caracterizar materiais porosos como a sílica SBA-15, que é amplamente utilizada em adsorção devido à sua estrutura mesoporosa altamente ordenada. As isotermas descrevem o equilíbrio entre a quantidade de uma substância adsorvida na superfície de um material sólido (adsorvente) e a concentração ou pressão dessa substância no meio circundante, a uma temperatura constante. Esse conceito é fundamental para entender a interação entre adsorventes e adsorvatos em processos como catálise, purificação de gases, tratamento de efluentes e imobilização enzimática. As isotermas permitem prever a capacidade de adsorção de um material, auxiliando no planejamento de sistemas industriais e laboratoriais.

A análise do formato da isoterma oferece informações importantes sobre a estrutura porosa do material adsorvente, além de ser uma metodologia amplamente consolidada para caracterizar texturalmente materiais com porosidade (THOMMES et al., 2015). A Figura 7 exibe a classificação das isotermas de equilíbrio de adsorção conforme os critérios estabelecidos pela IUPA (*International Union of Pure Applied Chemistry*).

Figura 7 - Classificação das isotermas de adsorção de acordo com a IUPAC.



Fonte: Adaptada de Thommes et al. (2015).

Thommes e colaboradores (2015) apresentaram as classificações das isotermas de adsorção em seu estudo. As isotermas de adsorção são divididas em seis tipos principais. As isotermas reversíveis do tipo I são dadas por sólidos microporosos com superfícies externas relativamente pequenas (por exemplo, alguns carvões ativados, zeólitas de peneira molecular e óxidos porosos). As isotermas do tipo I(a) são dadas por materiais microporosos que possuem predominantemente microporos estreitos (de largura $< \sim 1$ nm). Isotermas do tipo I(b) são encontradas em materiais com distribuições de tamanho de poros em uma faixa mais ampla, incluindo microporos mais largos e mesoporos estreitos ($< \sim 2,5$ nm).

Isotermas reversíveis do tipo II são características de adsorventes não porosos ou macroporosos, apresentando uma curvatura chamada Ponto B, que indica a formação de uma monocamada completa. Uma curvatura mais gradual (ou seja, um Ponto B menos distinto) é uma indicação de uma quantidade significativa de sobreposição da cobertura da monocamada e o início da adsorção de multicamadas.

No caso de uma isoterma do Tipo III, não há Ponto B e, portanto, nenhuma formação de monocamada identificável, e as interações adsorvente-adsorbato são relativamente fracas e as moléculas adsorvidas são agrupadas ao redor dos locais mais favoráveis na superfície de um sólido não poroso ou macroporoso.

As isotermas do Tipo IV são dadas por adsorventes mesoporosos (por exemplo, géis de óxido, adsorventes industriais e peneiras moleculares mesoporosas). O comportamento de adsorção em mesoporos é determinado pelas interações adsorvente-adsorvente e também pelas interações entre as moléculas no estado condensado. Uma característica típica das isotermas do Tipo IV é um platô de saturação final, de comprimento variável. No caso de uma isoterma do Tipo IV(a), a condensação capilar é acompanhada por histerese. Isso ocorre quando a largura do poro excede uma certa largura crítica, que depende do sistema de adsorção e da temperatura. Isotermas do tipo IV(b) é observada em adsorventes com mesoporos menores e é completamente reversível.

Isotermas do tipo V são semelhantes às do tipo III a baixas pressões relativas e isso pode ser atribuído a interações adsorbato-adsorvente relativamente fracas. Por fim, a isoterma do tipo VI é representativa da adsorção camada por camada em uma superfície não porosa altamente uniforme.

3. SEÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

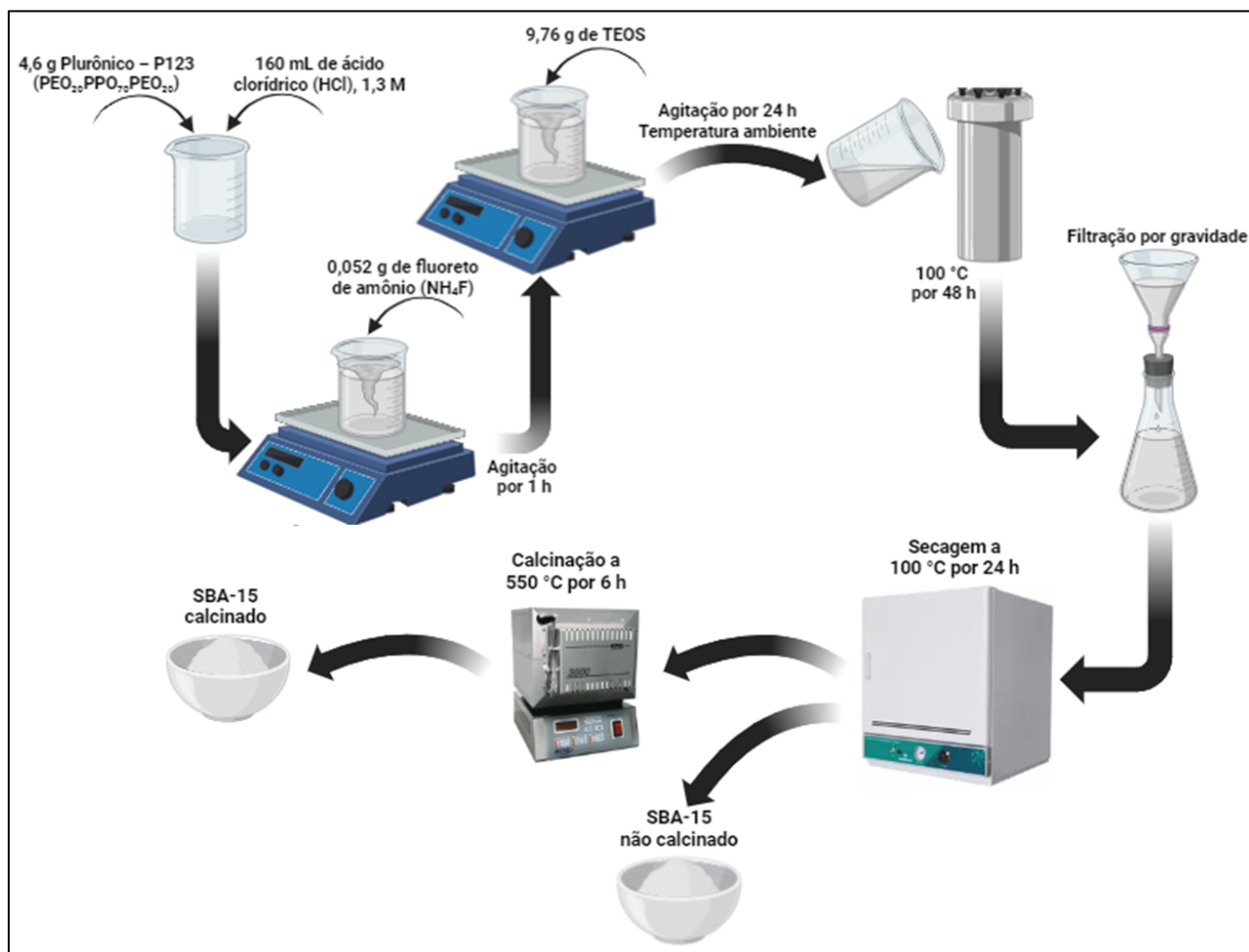
A lipase de *T. lanuginosus* (TLL) (15 mg de proteína por mL) foi obtida da Novozymes (Espanha). A atividade específica da TLL foi de (30 ± 1) U/mg de proteína, medida nas condições de reação descritas nas seções 3.2.6.1 e 3.2.7. Solução de glutaraldeído 25%, *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), triacetina e acetonitrila para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do inglês *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (grau de pureza, $\geq 99,9\%$), tetraetilortossilicato (TEOS) (grau de pureza, $\geq 98\%$), surfactante poli(etilenoglicol)-bloco-poli-(propileno glicol)-bloco-poli(etileno glicol) (P123), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). O fluoreto de amônio (NH_4F) foi adquirido da Vetec Química Fina Ltda. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese do SBA-15

O SBA-15 com poros expandidos foi sintetizado por rota hidrotérmica seguindo metodologia descrita por RIOS et al. (2018), usando NH_4F como expensor de poros, como mostrado na Figura 8. Neste procedimento, 4,6 g de Plurônico P123 ($\text{PEO}_{20}\text{PPO}_{70}\text{PEO}_{20}$) foram dissolvidos em 160 mL de solução de HCl (1,3 M), seguido da adição de 0,052 g de NH_4F sob agitação magnética a 25 °C. Após a dissolução dos reagentes, foram adicionados 9,76 g de tetraetilortossilicato (TEOS). A mistura foi agitada por 24 horas e, após esse tempo, transferida para autoclave de teflon para posterior reação a 100°C por 48 horas. Em seguida, o sólido formado foi filtrado e lavado com água destilada (200 - 400 mL) para remoção do excesso do molde orgânico (Plurônico) da estrutura. Posteriormente, o material foi seco por 24 horas a 100 °C. A última etapa da síntese foi a calcinação a 550 °C com taxa de aquecimento de 1 °C min⁻¹, mantendo o sistema por 6 h. A calcinação foi realizada para remoção do Plurônico remanescente. O SBA-15 foi obtido na forma de pó fino, como mostra a Figura 9, e foi utilizado como suporte antes da etapa de calcinação, identificado de SBA-15 não calcinado (SBANC) e após a etapa de calcinação, que chamamos de SBA-15 calcinado (SBAC).

Figura 8 - Esquema ilustrativo do processo de síntese do SBA-15, mostrando o desenvolvimento de cada etapa.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 9 - Suporte SBA-15 na forma de pó fino.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.2.2 Caracterização do suporte e dos biocatalisadores

Várias técnicas foram utilizadas para caracterizar o SBA-15: a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para evidenciar a presença de grupos funcionais na estrutura do material; as propriedades texturais, determinadas através de isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio a -196 °C; e a ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido, utilizada para obter a proporção total de silanol na superfície sólida.

3.2.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram coletadas em espectrofotômetro PerkinElmer® modelo Spectrum Two na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. Os espectros foram obtidos com as amostras na forma de pastilhas de KBr contendo 5% ($\text{m} \cdot \text{m}^{-1}$) da amostra (GUIMARÃES et al., 2023; VASCONCELOS et al., 2017).

3.2.2.2. Determinação das propriedades texturais do SBA-15

A área superficial específica (A_{BET}), o volume total de poros (V_{T}), o diâmetro médio de poros (d_p) e a distribuição de tamanho de poros (*Pore Size Distribution* – PSD) das amostras sólidas, foram determinadas a partir de isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio a -196 °C. As isotermas do N_2 foram medidas com auxílio do equipamento volumétrico Autosorb-iQ3 (*Quantachrome Instruments*, EUA).

Através do método Brunauer-Emmett-Teller (BET) (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938), de pontos múltiplos, foi determinada a área superficial específica das amostras sólidas, na faixa de pressão relativa de $P/P_0 = 0,05 - 0,25$, podendo ser calculada através da Equação 1 (ROUQUEROL et al., 2014), apresentada a seguir.

$$A_{\text{BET}} = n_{\text{M}} \cdot L \cdot \sigma \quad (1)$$

onde n_{M} é o número de moléculas necessário para cobrir a superfície com uma monocamada completa, L representa o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ moléculas) e σ é a área média ocupada por uma única molécula adsorvida em uma monocamada (para o

nitrogênio a -196 °C essa área é de 0,162 nm²) (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938; ROUQUEROL et al., 2014).

O número de mols pode ser determinado através da equação BET na sua forma linear (Equação 2), pelo gráfico de $(P/P_0)/n(1-(P/P_0))$ versus P/P_0 .

$$\frac{\left(\frac{P}{P_0}\right)}{n\left(1-\left(\frac{P}{P_0}\right)\right)} = \frac{1}{N_M C} + \left(\frac{C-1}{N_M C}\right) \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (2)$$

Em que P é a pressão do adsorbato, P₀ é a pressão de saturação na temperatura do experimento, n é o número de mols adsorvido e C é uma constante empírica da equação.

O volume total de poros foi calculado a partir de dados da isoterma de adsorção de nitrogênio em $P/P_0 = 0,98$ (a maior pressão relativa atingida). Este parâmetro expressa a quantidade de vazios específico (por unidade de massa) na estrutura do material adsorvente. A Equação 3 mostra como foi determinado o volume total de poros.

$$V_T = n \cdot \frac{MM}{\rho_{N_2}} \quad (3)$$

De modo que, n é o número de moles adsorvido na pressão relativa $P/P_0 = 0,98$ (a maior pressão relativa atingida), MM é a massa molar do nitrogênio (28,09 g/mol) e, ρ_{N_2} é a densidade do N₂ líquido (0,809 g/cm³).

O diâmetro médio dos poros foi calculado de acordo com a Equação 4 (RIOS et al., 2018). Esse parâmetro é importante, visto que a capacidade de adsorção de uma determinada substância é influenciada pelo tamanho dos poros acessíveis da partícula adsorvente, ou seja, para determinar se o diâmetro do material é compatível com o tamanho da enzima.

$$dp = 4 * \frac{V_T}{A_{BET}} \quad (4)$$

Sendo, V_T o volume total de poros que é determinado pela Equação 3 e A_{BET} a área superficial específica, determinada pela Equação 1.

A distribuição do tamanho dos poros foi determinada pelo método NLDFT (*Non-Local Density Functional Theory*) para poros cilíndricos (EVANS; MARCONI; TARAZONA, 1986; RAVIKOVITCH; NEIMARK, 2001; OJEDA-LÓPEZ et al., 2015) O método consiste na definição de um conjunto de isotermas teóricas (kernel) para uma

classe de materiais com formato de poro definido, como fendas, cilíndricos, esféricos, etc. Isso é feito para diferentes tamanhos de poro.

3.2.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise do ^{29}Si foi realizada pela técnica de desacoplamento de alta potência (HPDEC), a uma velocidade de rotação de 13 kHz, com sequência de desacoplamento cw para Si. As medições foram realizadas em uma sonda CPMAS de ressonância dupla de 4 mm. Os espectros de RMN ^{29}Si MAS (ressonância magnética nuclear de rotação de ângulo mágico) foram registrados com pulso de 8 μs a 90° , atraso de 60 s e 1000 varreduras. Os espectros foram registrados a 25°C num espectrômetro AVANCEIII HD 600 (Bruker AXS) utilizando uma sonda DVT de ressonância dupla de 4,0 mm a uma taxa de rotação de 13 kHz. O campo magnético foi de 14,1 T correspondendo a uma frequência de ressonância de ^{29}Si de 119,22 MHz. Os deslocamentos químicos do ^{29}Si são referenciados ao tetrametilsilano (TMS).

3.2.3 Representação estrutural da lipase *Thermomyces lanuginosus*

A estrutura tridimensional da lipase de *T. lanuginosus* foi obtida pela base de dados do Protein Data Bank (PDB). A codificação da TLL é 1DT3. A representação da estrutura proteica foi realizada utilizando o software UCFS Chimera (PETTERSEN et al., 2004).

3.2.4 Imobilização da lipase *Thermomyces lanuginosus* no SBA-15

A TLL foi imobilizada em SBA-15 por adsorção física produzindo os biocatalisadores SBANC-TLL e SBAC-TLL. Um grama de suporte pesado em balança analítica Mettler Toledo foi adicionado a 20 mL do tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7), contendo a enzima (1 ou 5 mg de proteína por grama de suporte). A imobilização foi realizada em reator batelada, sob agitação, a 25°C e o tempo de contato foi estudado. Em seguida, os biocatalisadores foram lavados com 60 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7.

3.2.5 Reticulação dos biocatalisadores heterogêneos com glutaraldeído

Um grama dos biocatalisadores (SBANC-TLL e SBAC-TLL), pesado em balança analítica Mettler Toledo, foi incubado em 10 mL de solução de glutaraldeído 1% (v/v)

em tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 7,0 por 1 h, produzindo os biocatalisadores heterogêneos SBANC-TLL-GA e SBAC-TLL-GA. O processo de reticulação foi conduzido em reator batelada, sob agitação, a 25 °C. Após a conclusão, as amostras foram lavadas com 30 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM em pH 7 e filtradas.

3.2.6 Determinação da atividade enzimática

3.2.6.1 Hidrólise do *p*NPB

As atividades enzimáticas da TLL livre e imobilizada foram determinadas medindo o aumento da absorbância, conforme metodologia descrita na literatura (ARANA-PEÑA et al., 2020a; DOS SANTOS et al., 2017; GARCIA-GALAN et al., 2014), com pequenas modificações descritas abaixo. O *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) de 50 mM em acetonitrila foi utilizado como solução de substrato. Para tanto, 50 µL de solução de *p*-NPB foram adicionados em uma cubeta contendo 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM em pH 7,0 e a reação foi iniciada adicionando 50 µL de solução enzimática ou suspensão imobilizada, sob agitação, por 90 s a 25 °C, em espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific (BR) (Modelo Biomate3). O produto colorido desta reação (*p*-nitrofenol) foi monitorado ao longo do tempo a 348 nm (nessas condições $\epsilon = 5,150 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Neste caso, uma unidade (U) de atividade da lipase corresponde à hidrólise de 1 µmol de *p*-NPB por minuto nas condições descritas anteriormente. As atividades da lipase solúvel e imobilizada são calculadas em U/mL e U/g, respectivamente.

3.2.6.2 Hidrólise da triacetina

A metodologia aplicada foi realizada conforme relatado por Arana-Peña et al., (2020a), com modificações. Para esta reação, uma massa de 0,2 gramas de biocatalisador de 5 mg/g foi adicionada a 5 mL de uma solução de triacetina 50 mM em solução de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A reação ocorreu a 25 °C, e foram avaliados diferentes tempos: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3 horas. As atividades foram determinadas utilizando taxas de conversão entre 15 e 25% para a produção de 1,2 diacetina. Esta análise foi realizada por CLAE Thermo Fisher Scientific (BR) (Modelo Surveyor Plus detector PDA), com coluna Kromasil C18 (15 cm x 0,46 cm) e detecção UV a 230 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução de acetonitrila 10/90% em água Milli-Q (v/v), com vazão

de 1 mL/min. Os tempos de retenção foram de 4 minutos para o produto e 23 minutos para o substrato.

3.2.7 Concentração de proteína

A concentração proteica foi determinada pelo protocolo de Bradford (BRADFORD, 1976) e a albumina de soro bovino (ASB) foi utilizada como proteína padrão. A metodologia é baseada em medidas espectrofotométricas a 585 nm de amostras previamente incubadas em 1 mL de reagente de Bradford por 10 minutos, realizada em espectro Biochrom (Modelo Libra S22).

3.2.8 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com a literatura (SILVA et al., 2012), a fim de avaliar a eficiência do biocatalisador produzido. Portanto, o rendimento de imobilização (R) foi determinado a partir da diferença entre a atividade inicial (At_i) e a atividade final (At_f) da enzima solúvel no sobrenadante durante o processo de imobilização, dividida pela atividade inicial, como mostrado na Equação 5.

$$R (\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} * 100 \quad (5)$$

A atividade teórica (At_T) representa a atividade que teoricamente seria obtida se todas as enzimas imobilizadas permanecessem ativas, e foi calculada multiplicando a quantidade de enzima oferecida para imobilização por grama de suporte (At_{off}) e o rendimento da imobilização, ver Equações 7 e 5.

$$At_T (U/g) = At_{off} * R / 100 \quad (6)$$

A At_{off} foi calculada pela Equação 7, onde V_{sol} é o volume de imobilização e $m_{suporte}$ é a massa do suporte.

$$At_{off} (U/g) = At_i \left(\frac{U}{mL} \right) * V_{sol} (mL) / m_{suporte} (g) \quad (7)$$

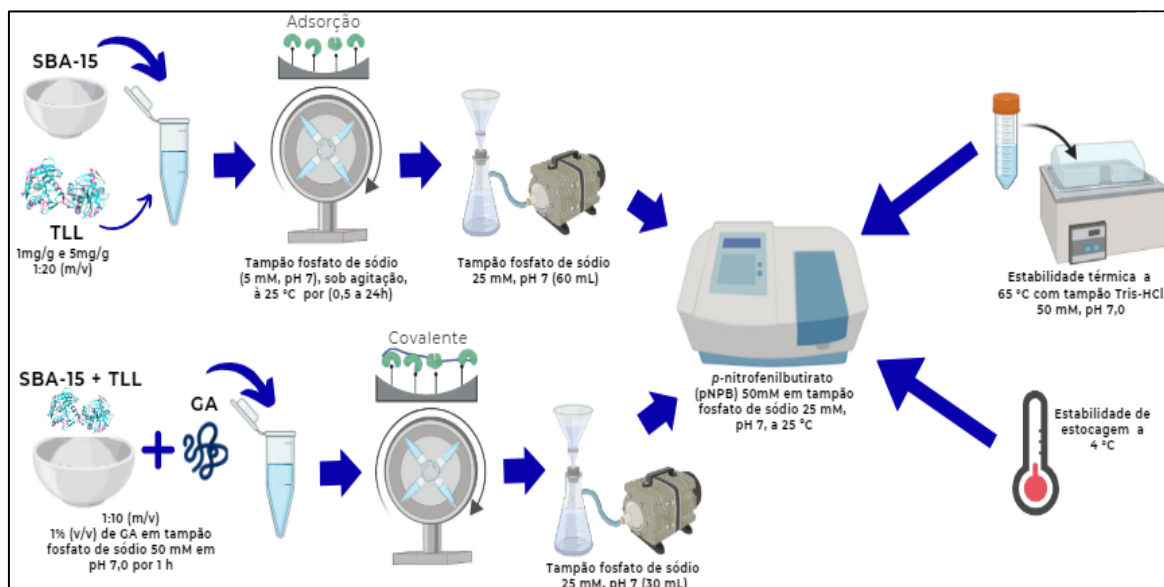
A atividade recuperada (At_R) representa a porcentagem de enzimas que permanecem ativas após a imobilização, e foi definida como a razão entre a atividade da enzima imobilizada (At_D (U/g)) e a atividade teórica, como apresentada na Equação 8.

$$At_R (\%) = \frac{At_D}{At_T} * 100 \quad (8)$$

3.2.9 Estabilidade Térmica

A inativação térmica do extrato enzimático comercial que contém a TLL solúvel foi estudada. Os estabilizadores foram primeiramente removidos por diálise, seguindo procedimento descrito na literatura (SILVA et al., 2023). O extrato foi então diluído em solução tampão de fosfato de sódio 5 mM com pH 7,0 e colocado em tubo de ultracentrífuga equipado com membrana de 10 kDa. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos. Este processo foi repetido quatro vezes para garantir a diálise completa do extrato enzimático. Então, a TLL solúvel e a TLL imobilizada (SBANC-TLL, SBANC-TLL-GA, SBAC-TLL e SBAC-TLL-GA) foram incubados a 65 °C com tampão Tris-HCl 50 mM em pH 7,0 por 24 horas. Periodicamente, foram coletadas amostras e a atividade foi medida utilizando o ensaio *p*-NPB descrito acima (seção 3.2.6.1). As curvas de desativação foram construídas ajustando um modelo de desativação proposto por Sadana e Henley (SADANA; HENLEY, 1987) para obter as meias-vidas ($t_{1/2}$), tempo necessário para que a atividade enzimática se reduza à metade da atividade inicial. O software Microcal Origin versão 8.5 foi utilizado para construir as curvas. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade inicial como 100%. O fator de estabilização (FE) é a razão entre $t_{1/2}$ da enzima imobilizada e $t_{1/2}$ da enzima livre. Os processos de imobilização, reticulação, bem como as estabilidades térmica e de estocagem estão representados na Figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática dos processos de imobilização, reticulação e estabilidades térmica e de estocagem.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

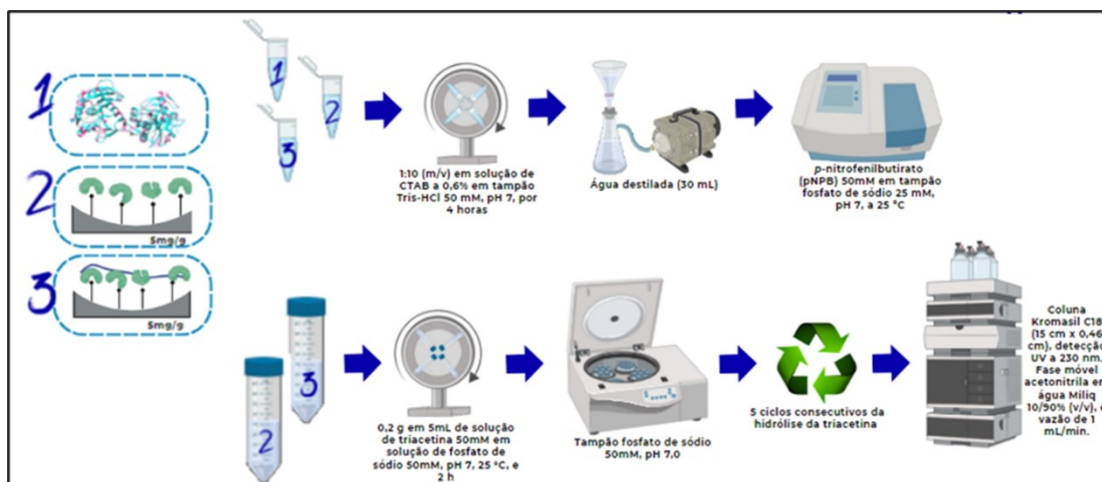
3.2.10 Ensaio de dessorção dos biocatalisadores com CTAB

O ensaio de dessorção foi conduzido conforme metodologia descrita anteriormente por Rodrigues et al. (2009) (RODRIGUES et al., 2009), com algumas modificações. A TLL foi dessorvida do SBA-15 suspendendo a enzima imobilizada em uma proporção de 1:10 (m/v) - um grama de enzima imobilizada em 10 mL de solução de CTAB a 0,6% em tampão Tris-HCl 50 mM em pH 7,0. O teste foi realizado a 25 °C por 4 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada e filtradas. A taxa de dessorção foi medida considerando a atividade dos biocatalisadores antes e após a incubação com CTAB.

3.2.11 Ensaio de estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados

As estabilidades operacionais dos biocatalisadores (carga enzimática 5 mg/g) foram avaliadas através de 5 ciclos consecutivos da hidrólise da triacetina (descrita na seção 3.2.6.2) a 25 °C. Após medição da atividade em cada ciclo, o biocatalisador heterogêneo foi lavado 3 vezes com tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,0 e reutilizado. A Figura 11 apresentada abaixo mostra o esquema ilustrativo dos processos de dessorção e estabilidade térmica.

Figura 11 – Representação esquemática dos processos de dessorção e estabilidade operacional.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.2.12 Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

Ensaio de eletroforese foram realizados, para todas as estratégias adotadas, conforme Laemmli (1970) (LAEMMLI, 1970). Os géis foram preparados na concentração de 12% de poliacrilamida para o gel separador e 5% para o gel de concentração. As amostras foram incubadas no tampão de ruptura (SDS a 4% e mercaptoetanol a 10%) e aquecidas à temperatura de ebulição durante 10 min. As amostras contendo glutaraldeído foram previamente reduzidas com solução de borohidreto de sódio em água (NaBH_4 - 1 mg/mL) por 30 minutos, para inativar a ação do glutaraldeído. Para verificação do padrão foi utilizado um marcador de baixo peso molecular (14,4 – 97 kDa) (GE - Healthcare Life Sciences). As bandas protéicas foram detectadas pelo método do nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

3.2.13 Análise estatística

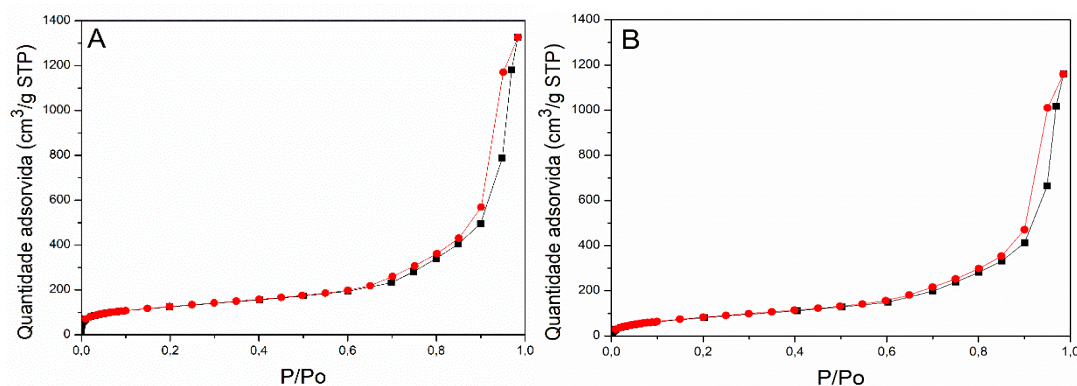
Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados são relatados como média e desvio médio absoluto, calculados no Microsoft Excel. Os dados numéricos das tabelas foram aproximados para uma casa decimal. Os resultados de armazenamento e estabilidade operacional foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey pelo *software* OriginPro 8.5. As diferenças significativas foram determinadas a um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do SBA-15

A compreensão dos processos de adsorção tem como fundamento essencial o entendimento do equilíbrio de adsorção. O estudo do equilíbrio de adsorção se baseia na análise de isotermas de adsorção, que relacionam, em uma temperatura constante, a quantidade adsorvida e a pressão de equilíbrio de um gás (ou concentração). A configuração da isoterma oferece subsídios valiosos sobre a estrutura porosa do adsorvente e é uma ferramenta amplamente reconhecida para a caracterização textural de materiais porosos (THOMMES et al., 2015). Dessa forma, inicialmente, o suporte SBA-15 foi caracterizado quanto às suas propriedades texturais. Portanto, foram determinados a área superficial, o volume total dos poros e o diâmetro médio dos poros. Para isso, as isotermas de adsorção e dessorção de N_2 para o SBA-15 calcinado e não calcinado foram obtidas e apresentadas na Figura 12 (A) e (B), respectivamente. Pode-se notar que ambos os suportes apresentam o mesmo comportamento. As isotermas obtidas são do tipo II e estão de acordo com a literatura, que relata tal comportamento como típico do SBA-15 sintetizado com fluoreto de amônio (RIOS et al., 2018; THOMMES et al., 2015). Tipicamente as curvas de adsorção e dessorção de N_2 para o SBA-15 são do tipo IV (características de adsorventes mesoporosos) (WANG; YANG, 2011; YUAN; WANG; YANG, 2014). No entanto, a adição de NH_4F modifica consideravelmente a estrutura desse material. Além de alterar o tipo de isoterma, também altera o arranjo ordenado a longo alcance.

Figura 12 - Isotermas de adsorção (■) e dessorção (●) de nitrogênio do SBA-15 calcinado (A) e não calcinado (B) sintetizado na presença de fluoreto de amônio.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A Tabela 1 apresenta as propriedades texturais do SBA-15 sintetizado no presente estudo, comparando os resultados com aqueles relatados por Vilarrasa-Garcia et al. (2015) e Rios et al. (2018). Observa-se que os parâmetros texturais obtidos são superiores, destacando a eficácia da metodologia empregada. O SBA-15 sintetizado neste trabalho apresentou uma área específica de 476 m²/g e 316 m²/g para o material calcinado e não calcinado, respectivamente, em comparação com 526 m²/g e 542 m²/g relatados por Rios et al. (2018) e Vilarrasa-Garcia et al. (2015) para materiais calcinados (Tabela 1). Porém, a literatura relata que a quantidade do agente expensor de poros (fluoreto de amônio) é um parâmetro importante para o diâmetro dos poros de materiais mesoporosos. Gao *et al.* (2010) sintetizaram diversos materiais mesoporosos, tipo SBA-15, com diâmetros de poros variando de 6,8 a 22,4 nm (GAO et al., 2010). Este resultado está de acordo com as isotermas do N₂, que são do tipo II, com mesoporos muito grandes. Ainda, na Tabela 1, comparamos os resultados deste trabalho com outra síntese de SBA-15 sem fluoreto de amônio, realizada por Vilarrasa-Garcia et al. (2015). Portanto, com a adição de NH₄F, o diâmetro médio dos poros aumenta, levando a uma menor área superficial específica do material.

A importância desses resultados reside na capacidade de adsorção da enzima dentro dos poros do material, protegendo a proteína de condições externas adversas e, assim, aumentando a estabilidade do biocatalisador (CARLSSON et al., 2014; RIOS et al., 2018). Além disso, enzimas imobilizadas em suportes com poros maiores induzem a produção de biocatalisadores com menos resistências difusionais internas (DORAN, 2012).

A literatura relata que o diâmetro da TLL em sua forma nanométrica é de 5 nm (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), obtido a partir de dados cristalográficos. Contudo, ao ser dissolvida em solução, a TLL pode sofrer hidratação e alterações conformacionais, resultando em um aumento do tamanho da proteína. A Tabela 1 demonstra que tanto o suporte não calcinado quanto o calcinado apresentam diâmetros médios de poros quase idênticos, que são 22,8 e 20,2 nm, respectivamente. Essas medidas são quatro vezes maiores que a forma nanométrica da TLL. Assim, o uso de SBA-15 não calcinado e calcinado com poros expandidos pode proporcionar a adsorção da TLL dentro de seus poros. No entanto, observa-se uma diferença mais significativa em termos de área superficial específica para os suportes. A amostra não calcinada possui menor área superficial devido à presença de surfactante nos poros (OJEDA-LÓPEZ et al., 2015). Os resultados deste estudo estão de acordo com os parâmetros obtidos por Ojeda-Lopez *et al.* (2015), uma vez que, para as amostras calcinadas, foram obtidos diâmetros de poros ligeiramente menores que o material não calcinado.

Tabela 1- Propriedades texturais do SBA-15 calcinado e não calcinado sintetizados neste trabalho, comparadas com dados da literatura.

Material	Área específica da superfície (m²/g)	Volume total de poros (cm³/g)	Diâmetro médio dos poros (nm)
SBA-15 calcinado sintetizado com NH ₄ F (deste trabalho)	476	2,4	20,2
SBA-15 não calcinado sintetizado com NH ₄ F (deste trabalho)	316	1,8	22,8
SBA-15 sintetizado com NH ₄ F (RIOS et al., 2018)	526	1,8	14,0
SBA-15 calcinado sintetizado com NH ₄ F (VILARRASA-GARCIA et al., 2015)	542	1,7	13,5
SBA-15 calcinado sintetizado sem NH ₄ F (VILARRASA-GARCIA et al., 2015).	908	1,7	8,0

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

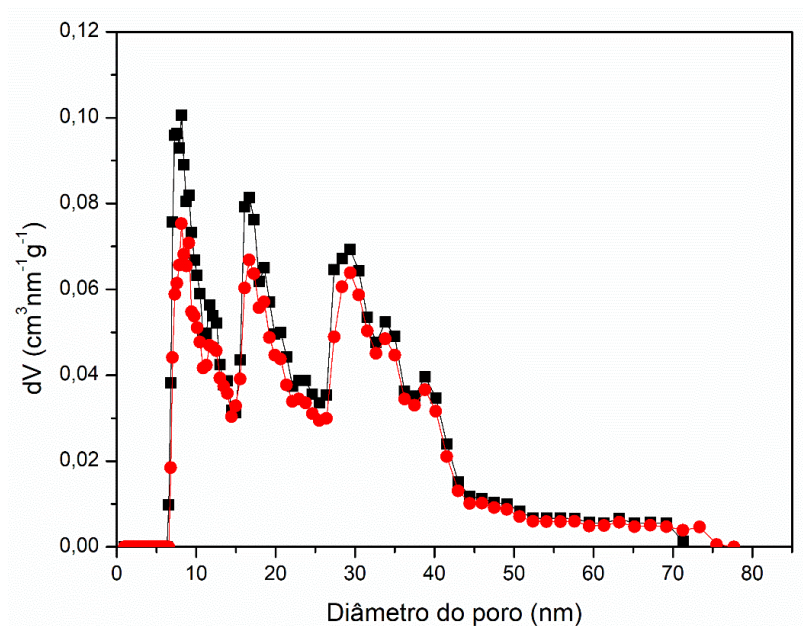
A Figura 13 apresenta as distribuições de tamanho de poro para o SBA-15 calcinado e não calcinado, utilizando o modelo NLDFT, obtidas para confirmar os resultados de diâmetro de poro do SBAC e SBANC encontrados através da Equação 4 (Seção 3.2.2.2), apresentados na Tabela 1. Os símbolos (■) representam o SBA-15 calcinado, enquanto os símbolos (●) correspondem ao SBA-15 não calcinado.

Observa-se que ambas as amostras exibem múltiplos picos de distribuição, indicando a presença de poros de diferentes tamanhos. O SBA-15 calcinado apresenta picos mais pronunciados em diâmetros menores, enquanto o SBA-15 não calcinado mostra uma distribuição mais ampla com picos em diâmetros maiores. Especificamente, o SBA-15 calcinado possui picos significativos em torno de 10 nm e 20 nm, sugerindo a presença de poros menores e mais uniformes. Em contraste, o SBA-15 não calcinado exibe uma distribuição de poros mais heterogênea, indicando poros mais amplos.

Essas diferenças nas distribuições de tamanho de poro podem ser atribuídas à presença de surfactante residual no SBA-15 não calcinado, que contribui para a formação de poros maiores e uma distribuição mais ampla. A calcinação remove esses resíduos, resultando em uma estrutura de poros mais uniforme e menor.

A presença de poros maiores no SBA-15 não calcinado pode ser vantajosa para a imobilização de grandes biomoléculas, como enzimas, que se beneficiam de um acesso facilitado aos poros. Por outro lado, a estrutura de poros menores e mais uniformes do SBA-15 calcinado pode ser mais adequada para aplicações que requerem uma alta área superficial específica e menor resistência à difusão interna.

Figura 13 – Distribuições de tamanho de poro utilizando o modelo NLDFT: SBA-15 calcinado (■) e não calcinado (●).



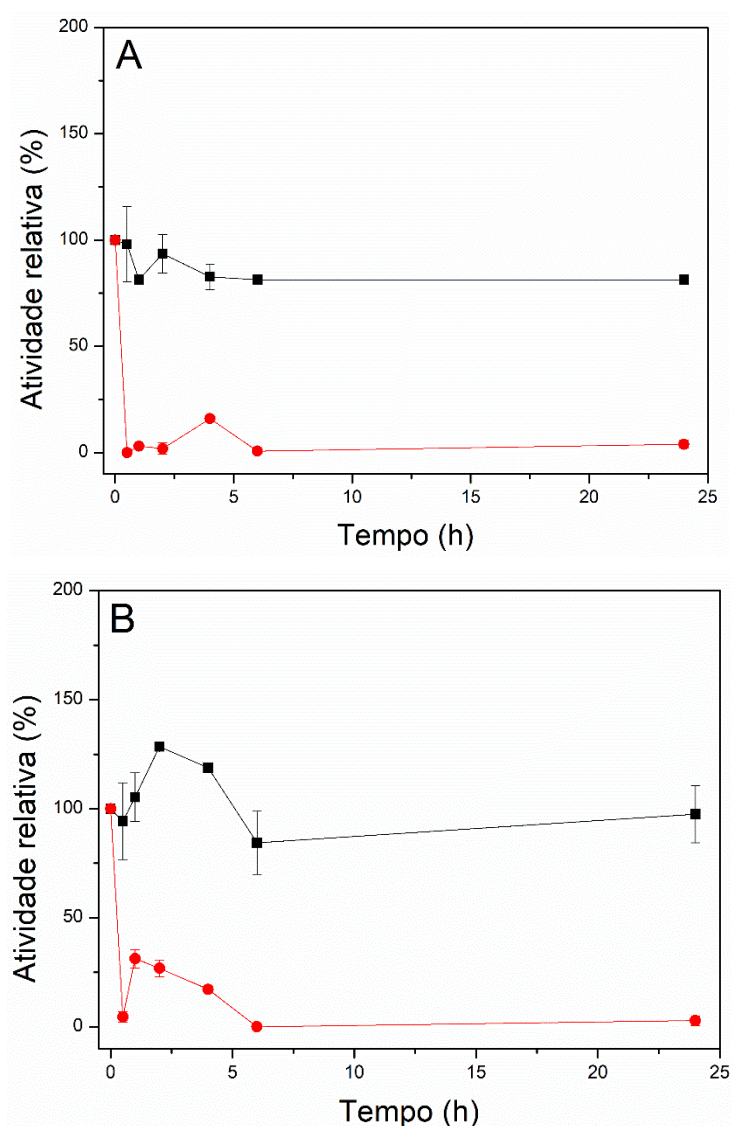
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2 Influência do tempo de contato na adsorção da TLL em SBA-15 não calcinado e calcinado

A sílica mesoporosa (SBA-15) foi sintetizada utilizando o Plurônico (PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀) como molécula surfactante. O P123 atua como agente direcionador de estrutura, sendo responsável pela formação de canais bem definidos e poros ordenados no material após sua remoção nas etapas de lavagem e calcinação (MAGNER, 2013). Considerando os parâmetros texturais encontrados (Tabela 1), ambos os materiais apresentam diâmetros médio de poros grandes o suficiente para imobilização da TLL.

Assim, para avaliar a influência da etapa de calcinação na adsorção da lipase, a TLL foi imobilizada tanto no material não calcinado quanto no calcinado. Além disso, avaliou-se o tempo de contato para a adsorção da TLL em ambos os materiais e os resultados obtidos são apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Efeito do tempo de contato no processo de adsorção da TLL em SBA-15 (A) não calcinado e (B) calcinado. Atividade do controle (■) e a atividade do sobrenadante (●). A atividade relativa (%) foi calculada considerando a atividade inicial como 100%. Nas condições descritas na seção métodos (3.2.4): tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7,0), carga enzimática: 1 mg/g, temperatura ambiente. As linhas representam a tendência dos dados experimentais.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Ao analisar a Figura 14A, observa-se que, no SBA-15 não calcinado, a lipase foi quase completamente adsorvida, alcançando rapidamente altos valores de rendimento de imobilização nas primeiras 6 horas e permanecendo estável ao longo do período avaliado. Isso sugere que o plurônico residual facilita a adsorção da TLL, promovendo interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte. Por outro lado, no SBA-15 calcinado (Figura 14B), a imobilização da TLL apresenta uma maior variabilidade nas primeiras horas, com picos de rendimento de imobilização em 0,5, 6 e 24 horas. Isso pode ser atribuído à ausência de surfactantes, que pode dificultar a formação de interações hidrofóbicas eficazes. Assim, às 24 horas de contato, o SBA-15 não calcinado e calcinado imobilizou quase totalmente a TLL, atingindo (100 ± 2) e (96 ± 1) % de rendimento de imobilização, respectivamente.

Durante o processo de imobilização, também foi analisada a atividade da lipase imobilizada após a lavagem para retirar a enzima fracamente adsorvida, e os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de imobilização por adsorção física da lipase de *T. lanuginosus* em SBA-15 não calcinado e calcinado. O experimento foi conduzido em tampão fosfato de sódio 5 mM em pH 7,0 e 25 °C. Carga enzimática oferecida: 1 mg de proteína por grama de suporte. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a Seção 3.2.6.1. Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com a Seção 3.2.8.

Tempo (h)	Biocatalisador SBANC-TLL		Biocatalisador SBAC-TLL	
	Atividade da lipase imobilizada (U/g)	Atividade recuperada (%)	Atividade da lipase imobilizada (U/g)	Atividade recuperada (%)
0,5	21 ± 2	58 ± 4	11 ± 1	34 ± 4
1	34 ± 1	79 ± 4	11 ± 1	47 ± 2
2	24 ± 3	67 ± 2	11 ± 0	48 ± 0
4	18 ± 0	66 ± 1	13 ± 0	46 ± 2
6	34 ± 2	77 ± 4	18 ± 3	55 ± 9
24	36 ± 1	83 ± 3	26 ± 1	69 ± 2

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os maiores valores de atividade da lipase imobilizada foram observados em 1h, 6h e 24h de contato para SBANC-TLL e às 24h para SBAC-TLL. A Tabela 2 também

mostra que a atividade recuperada do SBAC-TLL, que é definida como a porcentagem de enzima ativa que foi imobilizada, tende a aumentar ao longo do tempo no material calcinado. O maior valor é alcançado após 24 horas, que foi o tempo máximo avaliado. Pode-se observar também que a atividade recuperada do SBAC-TLL tende a aumentar com o rendimento de imobilização (conforme mostrado na Figura 14B). Portanto, considerando o tempo estudado, o período ideal de imobilização entre a TLL e o SBA-15 foi de 24 horas, uma vez que um número substancial de proteínas já havia sido adsorvido e as enzimas mantiveram sua atividade após o processo de adsorção.

Alguns autores também demonstraram que a adsorção da TLL em diferentes suportes é um processo rápido e eficaz (SILVA et al., 2023; ZAAK et al., 2017). O trabalho de Silva et al., (2023) estabeleceu um protocolo eficiente para a imobilização da lipase de *T. lanuginosus* (TLL) na resina fenólica Streamline (SILVA et al., 2023). Zaak et al., (2017), apresentaram a imobilização da TLL em octil-agarose com alto rendimento de imobilização, superior a 95%, com condições de imobilização semelhantes às deste trabalho (tampão fosfato 5 mM a 25 °C, com carga de 1mg/g) (ZAAK et al., 2017).

Comparando os suportes SBA-15 (Tabela 2), observa-se que a maior atividade recuperada foi alcançada após a imobilização da TLL no material não calcinado às 24 horas de contato (83%). Este comportamento pode ser explicado pela natureza surfactante do plurônico que ainda está presente nos poros do material não calcinado (SERRA et al., 2008). Além da imobilização em suportes hidrofóbicos, foi observado que os surfactantes podem induzir a forma aberta das lipases devido às interações entre os aminoácidos hidrofóbicos presentes na tampa da lipase e as porções hidrofóbicas dos surfactantes (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007; SILVA et al., 2023). Portanto, a natureza surfactante não iônica do plurônico permite a imobilização da lipase com maior atividade do que quando se utiliza o SBA-15 calcinado, no qual o plurônico foi completamente removido por lavagem e calcinação.

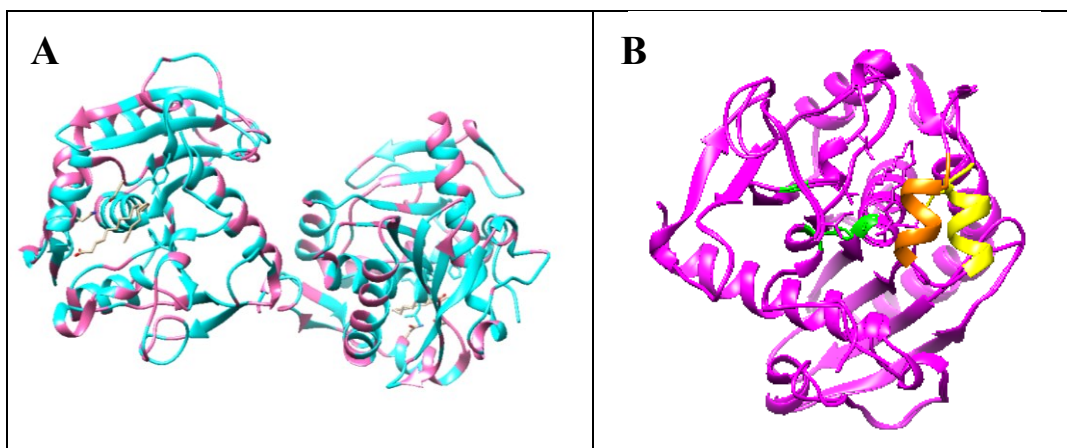
A Figura 15 destaca os aminoácidos hidrofóbicos na superfície externa da TLL e no sítio ativo da lipase, demonstrando a possibilidade de interações hidrofóbicas. A TLL é uma enzima interfacial com uma cadeia polipeptídica (tampa) cobrindo seu sítio ativo e muitos aminoácidos hidrofóbicos em sua superfície (Figura 15A e 15B). Essas características permitem interações hidrofóbicas entre a lipase e o suporte, fazendo com que a TLL seja adsorvida com seu sítio ativo exposto (forma aberta). Isto resulta em uma

maior atividade da lipase imobilizada em material não calcinado, que provavelmente retém surfactantes em sua superfície.

Essas características estruturais são fundamentais para a imobilização da TLL em suportes mesoporosos como o SBA-15. A presença de muitos aminoácidos hidrofóbicos na superfície da enzima facilita as interações hidrofóbicas com o suporte, especialmente quando a tampa está na forma aberta, expondo o sítio ativo. A imobilização da TLL em SBA-15 não calcinado, que ainda contém surfactantes como o plurônico, resulta em uma maior atividade da lipase devido à estabilização da forma aberta da enzima. Os surfactantes interagem com os aminoácidos hidrofóbicos, promovendo a adsorção da TLL com o sítio ativo exposto, o que aumenta a atividade catalítica.

A comparação entre as formas aberta (amarelo) e fechada (laranja) da tampa na Figura 15B ilustra como a interação com superfícies hidrofóbicas pode induzir a abertura da tampa, expondo o sítio ativo da lipase. Esse mecanismo é fundamental para entender a alta atividade recuperada observada no SBA-15 não calcinado. A capacidade de manter a lipase na forma aberta durante a imobilização é essencial para aplicações industriais, onde a atividade enzimática máxima é desejada. Os resultados sugerem que a escolha do suporte e a presença de surfactantes podem ser otimizadas para melhorar a eficiência da imobilização e a atividade da TLL.

Figura 15 - Representação da estrutura monomérica tridimensional da lipase de *T. lanuginosus* (TLL) extraída do Protein Data Bank – PDB (código 1GT6). (A) Aminoácidos hidrofóbicos em azul. (B) Sítio ativo em verde e movimento da tampa, em laranja na forma fechada (1DT3) e em amarelo na forma aberta (1GT6). As imagens foram geradas pelo programa UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.3 Biocatalisadores heterogêneos reticulados com glutaraldeído

Sabe-se que o uso de enzimas adsorvidas reversivelmente em sistemas reacionais apresenta alguns problemas. Um deles é que, a enzima pode se separar na presença de substratos ou produtos com natureza detergente, e a enzima também pode se mover através da superfície do suporte sólido, levando à sua inativação (DIAMANTI et al., 2022; RIOS et al., 2019a). Para superar esses problemas, o glutaraldeído foi utilizado como agente de reticulação. Este agente bifuncional é capaz de estabelecer ligações covalentes com grupos amino presentes na superfície externa da enzima, principalmente os resíduos de lisina (SILVA et al., 2023; WEETALL, 1974). Segundo Abellanas-Perez et al. (2023a), a modificação química realizada por diferentes agentes químicos pode ter comportamentos significativos (em relação à atividade e estabilidade) que dependem da carga enzimática, sugerindo que as interações lipase-lipase desempenham um papel significativo neste processo (ABELLANAS-PEREZ et al., 2023a). Assim, as preparações (SBAC-TLL e SBANC-TLL) de diferentes cargas enzimáticas (carga oferecida: 1 mg/g e 5 mg/g, a 50% da carga máxima (RIOS et al., 2018)) foram modificadas usando glutaraldeído, gerando novos biocatalisadores (SBAC-TLL-GA e SBANC-TLL-GA). O efeito da modificação do glutaraldeído nos parâmetros de imobilização das amostras em diferentes cargas enzimáticas é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito do glutaraldeído nos parâmetros de imobilização da lipase de *T. lanuginosus* (TLL) em diferentes cargas enzimáticas (1 mg/g e 5 mg/g). Imobilização em SBA-15 conforme seção 3.2.4 e modificação com GA conforme metodologia seção 3.2.5. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a Seção 3.2.6.1. Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com a Seção 3.2.8.

Biocatalisadores heterogêneos	Atividade da lipase imobilizada (U/g) 1 mg/g	Atividade recuperada (%) 1 mg/g	Atividade da lipase imobilizada (U/g) 5 mg/g	Atividade recuperada (%) 5 mg/g
SBAC-TLL	26 ± 0	69 ± 2	47 ± 2	36 ± 2
SBAC-TLL-GA	18 ± 0	50 ± 2	35 ± 2	27 ± 2
SBANC-TLL	36 ± 1	83 ± 3	47 ± 0	50 ± 1
SBANC-TLL-GA	27 ± 0	69 ± 1	16 ± 1	17 ± 2

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Analisando a Tabela 3, pode-se afirmar que todos os biocatalisadores produzidos diminuem suas atividades após a modificação do glutaraldeído. Para os biocatalisadores SBAC-TLL (1 mg/g e 5 mg/g) e SBANC-TLL (1 mg/g), as atividades diminuem cerca de 25–30% dos seus valores iniciais. Para o biocatalisador SBANC-TLL (5 mg/g), a diminuição da sua atividade foi mais evidente, diminuindo cerca de 66% do seu valor inicial. Uma explicação para isso pode estar relacionada ao número de moléculas de enzimas imobilizadas nos suportes e aos efeitos locais que diferentes cargas enzimáticas podem proporcionar. Pelos resultados da Tabela 1, o suporte calcinado possui área superficial específica maior (476 m²/g) que o suporte não calcinado (316 m²/g). Devido a isso, o suporte calcinado imobilizou (100 ± 0) % das moléculas enzimáticas com uma carga enzimática de 5 mg/g, enquanto o suporte não calcinado imobilizou apenas (80 ± 2) % com a mesma carga enzimática. Portanto, as interações entre moléculas lipase-lipase, induzidas pelo biocatalisador lotado, podem gerar uma diminuição mais pronunciada da atividade da lipase após a modificação do glutaraldeído.

Sheldon (2011) afirma que, comumente, a modificação enzimática provoca uma diminuição na atividade enzimática (SHELDON, 2011). Essa alteração está relacionada à reticulação inter ou intramolecular causada pelo glutaraldeído, que pode alterar as propriedades enzimáticas (atividade e estabilidade) (BARBOSA et al., 2012; ZAAK et al., 2017). Quanto à estabilidade, esta modificação pode proporcionar melhorias, uma vez que pode ocorrer a formação de ligações covalentes nas enzimas imobilizadas. Portanto, os parâmetros de estabilidade térmica, operacional e de armazenamento também foram avaliados neste trabalho e serão apresentados nas próximas seções.

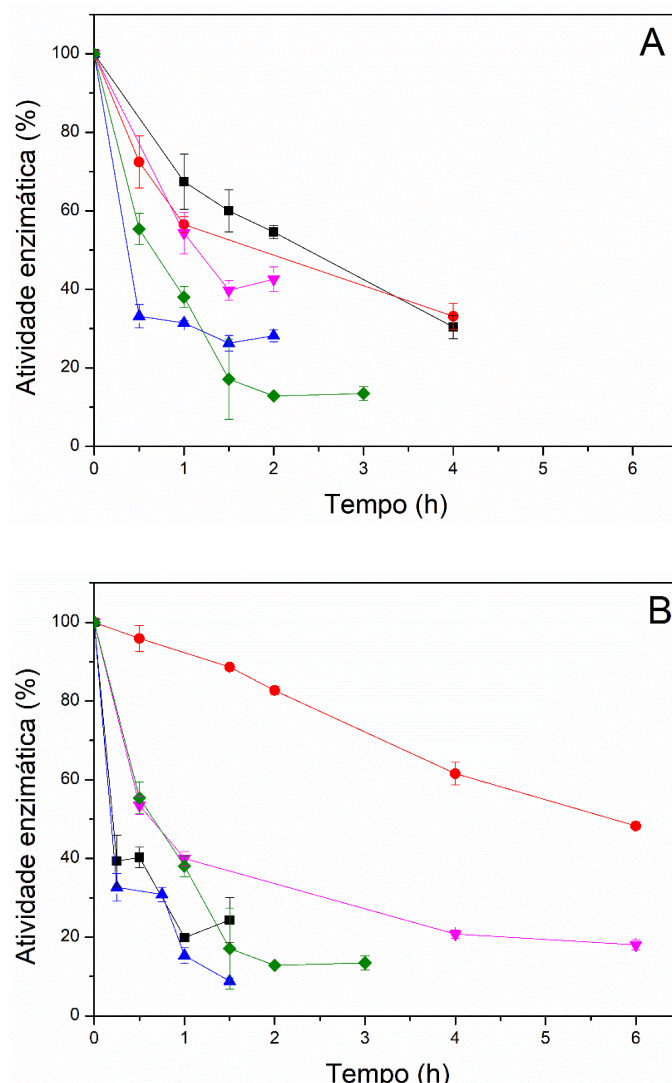
Diferentes protocolos de imobilização da TLL em SBA-15 calcinado também foram avaliados usando *p*NPB como substrato (AGUDELO et al., 2020; BABAKI et al., 2016). Agudelo et al. (2020) avaliaram os efeitos de diversos fatores para produzir partículas de sílica semelhantes a espuma mesocelular (MCF) a partir de um material de sílica mesoporosa nanométrica, incluindo a fonte de razão molar H⁺/sílica, a presença de um agente mineralizante, a temperatura de síntese e a presença de surfactantes combinados (por exemplo, P123 e CTAB), nas propriedades porosas do MCF (AGUDELO et al., 2020). Além disso, a superfície das partículas foi modificada com grupos amina para avaliar o desempenho como suporte para imobilização enzimática. Neste estudo, os biocatalisadores produzidos, MCF-NH₂-TLL e MCF-TLL, apresentaram rendimentos de 73% e 15%, respectivamente, enquanto a atividade enzimática por g de

suporte foi de 70,1 U/g e 14,5 U/g, respectivamente (AGUDELO et al., 2020). Babaki et al. (2016) relataram um rendimento de imobilização de 95% e uma atividade enzimática de $1150 \pm 9,2$ U/mg de enzima (BABAKI et al., 2016). No entanto, esses autores utilizaram uma etapa de funcionalização de suporte, e a TLL foi imobilizada por ligação covalente em SBA-15 funcionalizado com epóxi. Além disso, o estudo mencionado utilizou uma carga de imobilização de 38 mg/g, superior à utilizada no presente estudo. As diferenças na atividade podem estar relacionadas aos diferentes métodos de imobilização e cargas enzimáticas utilizadas. Os rendimentos de imobilização apresentados em nosso estudo para o SBA-15 calcinado, em diferentes cargas protéicas (1 mg/g e 5 mg/g), também foram elevados (> 95%).

4.4 Estabilidade térmica dos biocatalisadores

A Figura 16 mostra os perfis de desativação térmica dos biocatalisadores imobilizados, bem como da enzima solúvel. Os perfis foram ajustados seguindo o modelo de Sadana & Henley (1987).

Figura 16 - Estabilidade térmica da lipase de *T. lanuginosus* imobilizada e enzima solúvel em termos de atividade relativa. (A) carga enzimática 1 mg/g e (B) carga enzimática 5 mg/g. SBAC-TLL (■); SBAC-TLL-GA (●); SBANC-TLL (▲); SBANC-TLL-GA (▼); enzima solúvel (◆). O teste de estabilidade térmica foi realizado a 65 °C e pH 7,0, utilizando tampão Tris HCl (50 mM). (As linhas representam a tendência dos dados experimentais).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Ao avaliar os perfis de desativação térmica (Figura 16) e parâmetros (tempo de meia vida e fatores de estabilização) (Tabela 4), observa-se que o biocatalisador SBANC-TLL apresentou a menor estabilidade em carga baixa e alta ($t_{1/2}$ cerca de 0,2 h e 0,1 h para os biocatalisadores carregados com 1 mg/g e 5 mg/g, respectivamente). Estes valores foram inferiores aos da TLL solúvel ($t_{1/2}$ cerca de 0,6 h). Este comportamento pode indicar

que as possíveis interações da lipase com o plurônico (ainda presente na amostra não calcinada) que favorecem a atividade dos biocatalisadores (Tabela 2), prejudicam a estabilidade dos biocatalisadores. Após a modificação do glutaraldeído, as estabilidades dos biocatalisadores SBANC-TLL (1 mg/g e 5 mg/g) foram melhoradas ($t_{1/2}$ cerca de 1,1 h e 0,6 h para os biocatalisadores carregados com 1 mg/g e 5 mg/g, respectivamente). Isto pode indicar a formação de reticulações intra ou intermoleculares pelo glutaraldeído, produzindo biocatalisadores mais estáveis (em comparação com seus biocatalisadores não modificados). Além disso, esses parâmetros também foram superiores quando comparados com a TLL solúvel, atingindo fatores de estabilização de 1,83 e 1,00 (SBANC-TLL-GA com carga de 1mg/g e com carga de 5mg/g, respectivamente)

Para as amostras calcinadas, o SBAC-TLL (1 mg/g) apresentou meia-vida superior à enzima solúvel, 2,1 h e 0,6 h, respectivamente. O fator de estabilização alcançado foi de 3,50. Após a modificação com glutaraldeído, o SBAC-TLL-GA (1 mg/g) apresentou menor estabilidade ($t_{1/2}$ cerca de 1,3 h) do que o SBAC-TLL (1 mg/g), no entanto, permaneceu superior à enzima solúvel (Tabela 4). A literatura relata que o glutaraldeído pode reagir preferencialmente com grupos amino primários das enzimas, aumentando a rigidez e estabilidade da enzima (BARBOSA et al., 2014; RUEDA et al., 2016; SILVA et al., 2023). No caso da TLL, esses grupos estão presentes nos resíduos de lisina e o GA pode reagir com esse aminoácido (BARBOSA et al., 2014; SILVA et al., 2023). Segundo Barbosa e colaboradores (2014), é possível formar bases de Schiff entre os grupos amino primários da TLL e os grupos aldeído do glutaraldeído, quando a reação ocorre em pH neutro (BARBOSA et al., 2014).

Porém, a estrutura da TLL possui poucos e bem espaçados resíduos de lisina, como mostrado por Silva *et al.* (2023). O autor explica que a longa distância entre os grupos lisina prejudica a reação entre amino/glutaraldeído e glutaraldeído/amino para reticulação em reatividade máxima, dificultando o aumento da rigidez da enzima (SILVA et al., 2023). Este comportamento também ocorreu neste estudo, uma vez que a estabilidade do SBAC-TLL-GA (1 mg/g) não foi melhorada em relação ao biocatalisador SBAC-TLL (1 mg/g), evidenciando que apenas um ponto específico pode produzir uma modificação química usando glutaraldeído.

Tabela 4 - Parâmetros de desativação térmica da lipase de *T. lanuginosus* imobilizada e da enzima solúvel, segundo modelo de Sadana e Henley (1987). Carga enzimática 1 mg/g e 5 mg/g. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com a Seção 3.2.6.1 e os parâmetros de estabilidade térmica foram calculados de acordo com a Seção 3.2.9. O fator de estabilização (FE) é a razão entre $t_{1/2}$ da enzima imobilizada e $t_{1/2}$ da enzima livre.

Biocatalisador heterogêneo	Carga enzimática 1 mg/g			Carga enzimática 5 mg/g		
	R ²	$t_{1/2}$ (h)	FE	R ²	$t_{1/2}$ (h)	FE
SBAC-TLL	0,98	2,1	3,50	0,95	0,2	0,33
SBAC-TLL-GA	0,98	1,3	2,17	0,99	5,7	9,50
SBANC-TLL	0,99	0,2	0,33	0,94	0,1	0,17
SBANC-TLL-GA	0,98	1,1	1,83	0,99	0,6	1,00
TLL solúvel	0,98	0,6	—	0,98	0,6	—

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O melhor resultado de estabilidade térmica foi obtido com o biocatalisador SBAC-TLL-GA imobilizado na carga de 5 mg/g, ultrapassando a meia-vida da enzima livre em 5,1 horas. Esse comportamento pode ser explicado devido à possível reticulação intermolecular que se formou com o glutaraldeído após imobilização com maior carga enzimática (5 mg/g) (ABELLANAS-PEREZ et al., 2023b). Neste caso, em altas cargas enzimáticas, as moléculas de enzima tendem a estar mais próximas umas das outras, permitindo a fácil reticulação intramolecular com reatividade máxima (a reação entre amino/glutaraldeído de uma molécula de lipase e glutaraldeído/amino de outra molécula de lipase). Levando em consideração os resultados obtidos até o momento, considerou-se que a melhor opção seria o SBA-15 calcinado com carga de 5 mg/g.

4.5 Caracterização do SBA-15 antes e depois da adsorção da lipase

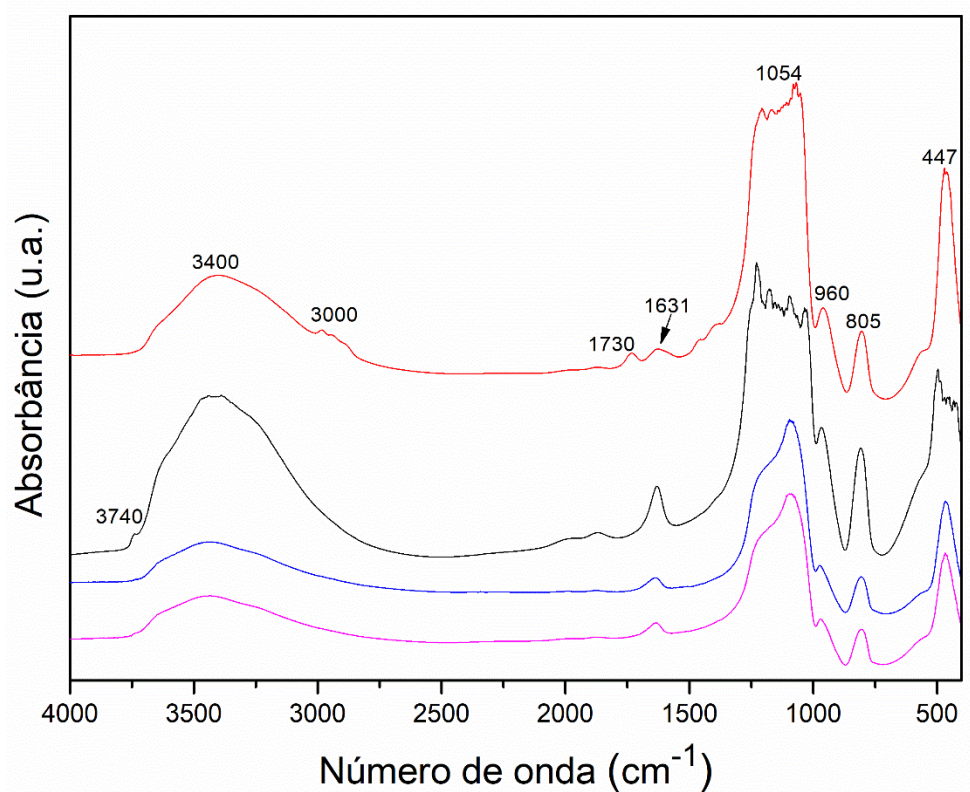
Os espectros de FTIR do SBA-15 foram avaliados em material não calcinado (SBANC) e calcinado (SBAC), bem como após adsorção enzimática (SBAC-TLL) e reticulação com glutaraldeído (SBAC-TLL-GA) para amostras calcinadas. Esses resultados são apresentados na Figura 17. Na amostra pura de SBA-15 calcinado, foram observados todas as bandas características deste material, indicando que a síntese do

SBA-15 foi eficiente: em 447 cm^{-1} é a banda característica do Si-O-Si; a banda em 805 cm^{-1} é atribuído ao modo de flexão Si-O-Si; a banda em 960 cm^{-1} que representa as vibrações de estiramento do silanol no plano Si-O; a banda em 1054 cm^{-1} que demonstra uma densa rede de sílica no material; a banda em 1631 cm^{-1} é equivalente às vibrações de flexão H-O-H na estrutura SBA-15; a banda larga em 3400 cm^{-1} representa as interações entre grupos silanol e moléculas de água adsorvidas no suporte; e a banda muito pequena em 3740 cm^{-1} , que mostra vibrações de estiramento O-H dos grupos Si-OH (RASHID et al., 2019; RIOS et al., 2022; VILARRASA-GARCÍA et al., 2014; VILARRASA-GARCIA et al., 2015)

Na amostra não calcinada, observou-se levemente espectros em torno de $1300\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ e $2800\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$ referentes à vibração de estiramento C-H, indicando a presença do copolímero plurônico P123 remanescente, que não pôde ser completamente removido na lavagem e na secagem apenas no forno a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, em comparação com a amostra calcinada a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BÉRUBÉ; KALIAGUINE, 2008; RASHID et al., 2019).

Além disso, na amostra não calcinada também foi observado o pico em 1730 cm^{-1} . Segundo Rashid e colaboradores (2019), esta banda (1730 cm^{-1}) refere-se ao modo de estiramento das vibrações das ligações C=O assimétricas e simétricas do surfactante P123. Esta posição (1730 cm^{-1}) não é observada nos demais espectros (amostras SBAC, SBAC-TLL e SBAC-TLL-GA). Esses resultados estão de acordo com a literatura, que relata que amostras calcinadas em temperaturas acima de $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ não apresentam banda nesta posição, possivelmente devido à remoção total do plurônico P123 (RASHID et al., 2019).

Figura 17 - Espectros de FTIR dos materiais estudados: SBANC (linha vermelha); SBAC (linha preta); SBAC-TLL (linha azul); SBAC-TLL-GA (linha roxa).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A banda fraca em 3740 cm^{-1} , observada no material calcinado (SBAC), referente às vibrações de estiramento O-H dos grupos silanol (Si-OH) (RASHID et al., 2019; RIOS et al., 2022; VILARRASA-GARCÍA et al., 2014; VILARRASA-GARCIA et al., 2015), desaparece após o processo de imobilização, nas amostras SBAC-TLL e SBAC-TLL-GA. Este resultado indica a interação entre a enzima e os grupos Si-OH do suporte (RIOS et al., 2018)

Após a modificação com glutaraldeído, não foram encontradas diferenças nos espectros de FTIR. Isso pode ser devido à baixa concentração de glutaraldeído utilizada (1%; v/v), prejudicando a visualização de alterações nos espectros. Outros autores notaram um pico estreito em 1740 cm^{-1} , que corresponde à vibração de estiramento da ligação C=O na molécula de aldeído (RIOS et al., 2016). Isso indica a ativação do SBA-15 com moléculas de glutaraldeído, provavelmente devido ao uso de maior concentração de glutaraldeído (15%; v/v) (RIOS et al., 2016). No entanto, é importante mencionar que os efeitos da modificação do glutaraldeído foram observados na análise indireta da

estabilidade enzimática, quando, em alguns casos, foram produzidos biocatalisadores estabilizados após a modificação com glutaraldeído (ver seção 3.2.5).

A posição das principais bandas das amostras de SBA-15 observadas na Figura 17, estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5 - Posição das principais vibrações de ligações químicas das amostras SBANC, SBAC, SBAC-TLL, SBAC-TLL-GA detectadas na região de 4000-400 cm^{-1} .

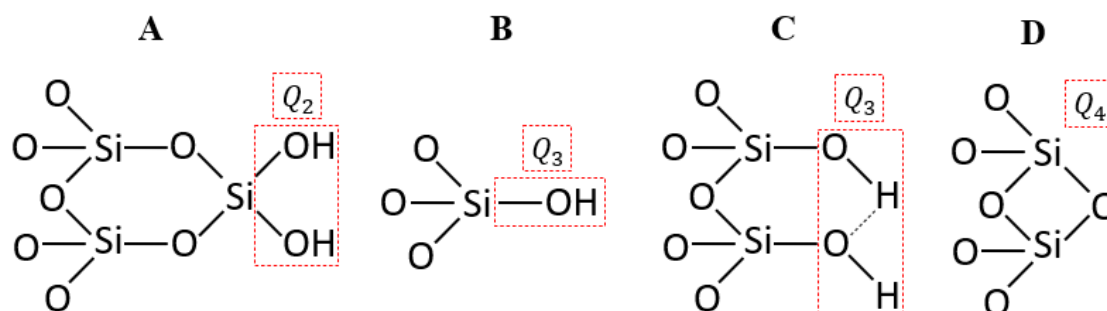
Número de onda (cm^{-1})	Grupos de base e modos vibracionais
447	deformação simétrica do Si–O–Si
805	modo de flexão Si–O–Si
960	estiramento de grupos Si-OH
1054	estiramento assimétrico da estrutura Si-O-Si
1631	vibrações de flexão H–O–H
1730	vibrações das ligações $>\text{C}=\text{O}$ assimétricas e simétricas do surfactante P123
3000	vibração de estiramento C-H
3400	vibração de estiramento da ligação de hidrogênio intermolecular (O-H) observada devido às moléculas de água superficiais absorvidas e também, para grupos Si-OH presentes
3740	vibrações de estiramento O-H dos grupos Si-OH

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A espectroscopia de RMN de ^{29}Si também foi avaliada. Nesta análise, os grupos silanol são nomeados de sítios “Q”. Previamente, vale ressaltar que existem dois grupos químicos principais na superfície dos materiais SBA-15: o grupo siloxano com caráter hidrofóbico ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) e o grupo silanol com caráter hidrofílico ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) (OJEDA-LÓPEZ et al., 2015; VANSANT; VOORT; VRANCKEN, 1995)

O grupo silanol é subdividido em silanol geminais (dois grupos silanol ligados a um átomo de silício) e são denominados “sítios Q_2 ”; silanol únicos isolados (um átomo de silício na superfície está ligado a três O–Si e um –OH) e vicinais (dois grupos silanol estão ligados por ponte de hidrogênio), chamados “sítios Q_3 ”. As pontes de siloxano ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) são os “sítios Q_4 ” (LA VARS et al., 2013; OJEDA-LÓPEZ et al., 2015; VANSANT; VOORT; VRANCKEN, 1995). A Figura 18 mostra os grupos silanol.

Figura 18 - Composição química da sílica: (A) grupo silanol geminal, (B) grupo silanol isolado ou livre, (C) grupo silanol vicinal ou em ponte e (D) grupo siloxano.

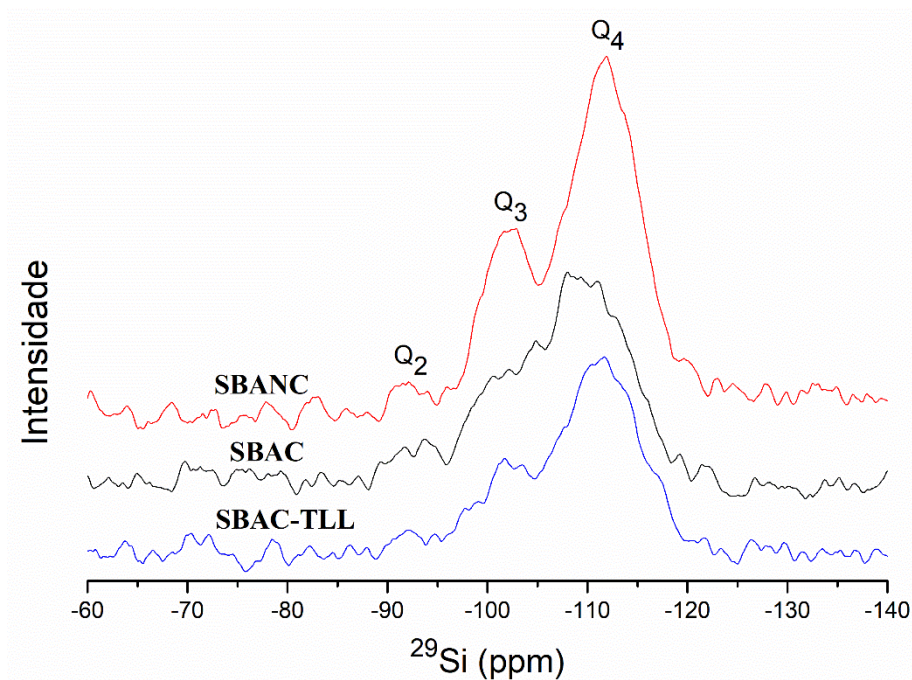


Fonte: Elaborada pela autora (2023). Adaptado de Ojeda-López et al. (2015).

A parte principal da matriz sólida é constituída por siloxano. A condensação de dois grupos silanol produz um grupo siloxano (OJEDA-LÓPEZ et al., 2015).

A Figura 19 mostra os espectros de RMN de ^{29}Si obtidos pela técnica HPDEC para os materiais SBA-15: amostra não calcinada (SBANC), calcinada (SBAC) e imobilizada (SBAC-TLL). A amostra SBANC apresenta três sinais: Q_2 (silanol geminais) a -93 ppm, Q_3 (silanóis livres e vicinais) a -102 ppm e Q_4 (siloxano) a -112 ppm (LA VARS et al., 2013). No espectro da amostra SBAC, observa-se os sinais Q_2 e Q_4 e o desaparecimento quase total do sinal Q_3 , o que sugere que a maioria dos grupos silanol livres e vicinais reagiram para formar ligações de siloxano após a calcinação, através de reações de condensação favorecidas pelo aumento da temperatura (OJEDA-LÓPEZ et al., 2015). No espectro referente à amostra imobilizada (SBAC-TLL), identificamos os sinais Q_3 e Q_4 , e não é possível visualizar o sinal Q_2 . Neste caso, o desaparecimento do sinal Q_2 pode estar relacionado às interações da enzima com os grupos silanol geminais, como observado no FTIR. Por outro lado, o aparecimento do sinal Q_3 pode ser devido à umidade do biocatalisador, na qual dois grupos silanol estão ligados por uma ponte de hidrogênio.

Figura 19 - Espectro RMN HPDEC de ^{29}Si do SBA-15.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.6 Dessorção dos biocatalisadores imobilizados com surfactante CTAB

O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi utilizado para avaliar a taxa de dessorção dos biocatalisadores heterogêneos em contato com compostos surfactantes. Primeiramente, avaliou-se a atividade da lipase solúvel em contato com a solução de CTAB ao longo do tempo para garantir que qualquer diminuição na atividade das amostras imobilizadas após contato com o surfactante não fosse atribuída à inativação da enzima, mas apenas à dessorção da enzima do suporte. Logo, o tempo de contato em que a TLL solúvel manteve 100% da sua atividade inicial quando em contato com 0,6% (m/v) de CTAB, foi de 4 horas. Sendo assim, o ensaio de dessorção dos biocatalisadores foi realizado nesse tempo (4 horas). Neste caso, avaliou-se a atividade da TLL solúvel em contato com a solução de CTAB e foi observado um pequeno aumento na atividade de 8 U/mL (sem a presença de CTAB) para 11 U/mL (incubado com o surfactante). Isto foi possível porque o sítio ativo da enzima foi exposto na presença da parte hidrofóbica do CTAB, podendo interagir com o substrato através do mecanismo de ativação interfacial, mantendo sua forma aberta estabilizada (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007; SILVA et al., 2023).

Assim, as enzimas imobilizadas, SBAC-TLL e SBAC-TLL-GA, foram colocadas em contato com a solução de CTAB. A Tabela 6 apresenta os resultados do efeito do surfactante CTAB na atividade dos biocatalisadores estudados. Observou-se que houve aumento na atividade de todos os biocatalisadores após contato com o surfactante (ver Tabela 6). A atividade da TLL solúvel com CTAB aumentou para 10 U/mL, em comparação com a atividade da enzima solúvel sem incubação com CTAB, de 7 U/mL. A literatura relata resultados semelhantes, com aumento da atividade da TLL imobilizada, ao utilizar detergente CTAB nas mesmas condições (0,6% (m/v)) (SILVA et al., 2023).

Os biocatalisadores heterogêneos foram colocados em contato com a solução CTAB durante as mesmas 4 horas que a enzima solúvel. Após esse período, o SBAC-TLL perdeu aproximadamente 70% de sua atividade inicial. O CTAB, um surfactante catiônico, pode desestabilizar as interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte devido à sua capacidade de inserir sua porção hidrofóbica nas interfaces hidrofóbicas, enquanto sua parte hidrofílica interage com a solução aquosa. Este processo pode levar à dessorção da enzima, como evidenciado pela significativa perda de atividade observada no SBAC-TLL após 4 horas de incubação. Como a imobilização provavelmente ocorreu por meio de interações hidrofóbicas, esse resultado já era esperado, pois esse tipo de ligação pode ser quebrada pelo surfactante (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007). Porém, apesar disso, as enzimas adsorvidas no SBA-15 calcinado não foram completamente dessorvidas do suporte após 4 h de incubação com CTAB. Isto indica que houve interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte. A interação hidrofóbica entre a TLL e outros suportes hidrofóbicos já foi apresentada em diferentes estudos (LAGE et al., 2016; SILVA et al., 2023).

Tabela 6 - Efeito do surfactante Cetiltrimetilamônio 0,6% (m/v) (CTAB) na atividade da lipase solúvel de *T. lanuginosus* (expressa em U/mL) e preparações imobilizadas com carga de lipase de 5 mg/g (expressa em U/g).

Biocatalisadores	Atividade às 0 h de incubação (U/mL)	Atividade após 4 h de incubação (U/mL)
TLL	7 ± 0	8 ± 0
TLL + CTAB	10 ± 0	11 ± 0
SBAC-TLL	53 ± 0	16 ± 0
SBAC-TLL-GA	45 ± 1	17 ± 1

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

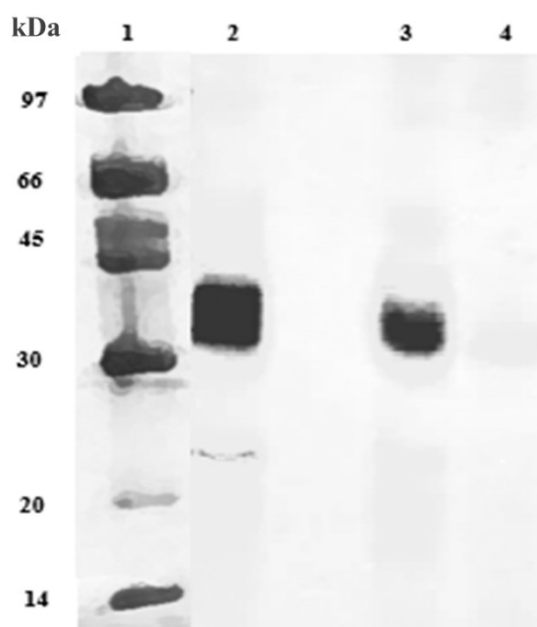
O biocatalisador modificado com glutaraldeído (SBAC-TLL-GA) dessorveu um pouco menos moléculas enzimáticas que o SBAC-TLL, cerca de 63% de sua atividade inicial. Embora este biocatalisador tenha sido o mais estável termicamente (seção 4.4), no ensaio de dessorção, a modificação com glutaraldeído previne apenas parcialmente a quebra de interações hidrofóbicas pelo surfactante CTAB. Portanto, apenas a modificação com glutaraldeído da enzima imobilizada em maior carga (5 mg/g) não foi capaz de prevenir a dessorção da lipase. Resultado semelhante foi apresentado por Silva *et al.* (2023). Para reduzir a dessorção enzimática observada, a modificação prévia do biocatalisador com polietilenoimina (PEI) pode ser conduzida. A PEI, com sua capacidade de aumentar a densidade de grupos amina na superfície da enzima, pode potencializar a reticulação com glutaraldeído, criando uma rede mais estável e resistente à ação de surfactantes. Estudos indicam que a reticulação dupla, envolvendo PEI e glutaraldeído, resulta em biocatalisadores com maior estabilidade e menor taxa de dessorção (ABELLANAS-PEREZ et al., 2023b; SILVA et al., 2023).

4.7 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada para confirmar o tipo de ligação envolvida nas imobilizações. Para isso, as amostras foram submetidas a condições extremas de inativação: incubação na presença de SDS 4% por 10 minutos a 100 °C. Através desta metodologia, enzimas que interagem através de ligações fracas (iônicas e hidrofóbicas) são liberadas do suporte, pela ação do tampão de ruptura e da alta temperatura e assim as

enzimas são transferidas para o sobrenadante. As interações fortes, como interações covalentes, não permitem que a enzima seja liberada do suporte mesmo nas condições do tampão de ruptura e alta temperatura. Espera-se que este último ocorra em amostras modificadas com glutaraldeído, devido à possibilidade de formação de fortes ligações de interação. O gel de eletroforese mostrado na Figura 20 exibe esses comportamentos.

Figura 20 - Eletroforese da lipase de *T. lanuginosus* solúvel e imobilizada antes e depois da reticulação com glutaraldeído. As amostras foram colocadas no gel na concentração de 0,5 mg/mL. 1- Marcador de baixo peso molecular (BPM); 2- TLL solúvel; 3- SBAC-TLL; 4- SBAC-TLL-GA. As preparações imobilizadas foram carregadas a 5 mg/g.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

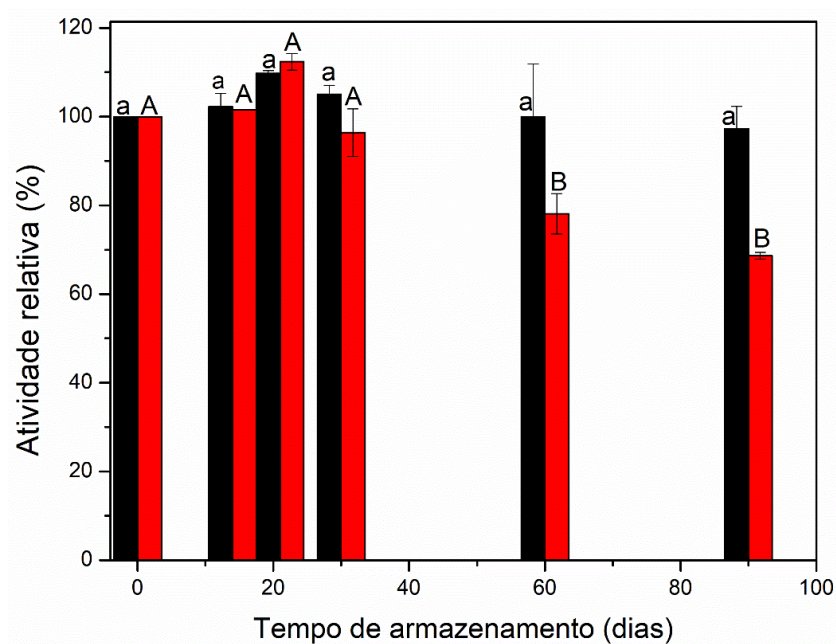
Na Figura 20, a amostra 2 mostra a banda da TLL solúvel, confirmando seu peso molecular esperado de aproximadamente 31,7 kDa (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; LOKHA et al., 2020). A amostra 3, correspondente ao biocatalisador SBAC-TLL, apresenta uma banda clara similar à da TLL solúvel, indicando que a enzima foi liberada do suporte, confirmando interações fracas como iônicas e hidrofóbicas. A amostra 4, SBAC-TLL-GA, não mostra uma banda clara, sugerindo que a modificação com glutaraldeído formou ligações covalentes fortes, mantendo a enzima no suporte mesmo após tratamento com SDS e calor. O glutaraldeído forma ligações covalentes com grupos amino presentes nos resíduos de lisina da enzima, criando bases de Schiff. Essas ligações

covalentes são muito mais fortes do que as interações iônicas ou hidrofóbicas, o que explica a resistência da enzima imobilizada modificada com glutaraldeído às condições de ruptura extrema utilizadas na SDS-PAGE.

4.8 Estabilidade de estocagem dos biocatalisadores heterogêneos

A estabilidade de estocagem dos biocatalisadores SBAC-TLL e SBAC-TLL-GA foi avaliada a 4°C. A atividade enzimática foi testada em diferentes momentos durante 90 dias e os resultados obtidos foram apresentados na Figura 21.

Figura 21 - Estabilidade de estocagem dos biocatalisadores heterogêneos. Preto: SBAC-TLL; Vermelho: SBAC-TLL-GA. Os biocatalisadores imobilizados foram carregados a 5 mg/g. Letras diferentes representam valores que apresentam diferença significativa (nível de significância de 95%). Letras minúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL e letras maiúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL-GA.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Conforme mostrado na Figura 21, não houve diferenças estatisticamente significativas nas atividades dos biocatalisadores heterogêneos após 30 dias de armazenamento em comparação com a sua atividade inicial. A preparação SBAC-TLL manteve sua atividade próxima de 100% nos demais tempos avaliados (60 e 90 dias). Porém, após 60 dias de armazenamento, a amostra imobilizada modificada com glutaraldeído apresentou perda significativa de atividade, reduzindo-a para $(78 \pm 5) \%$.

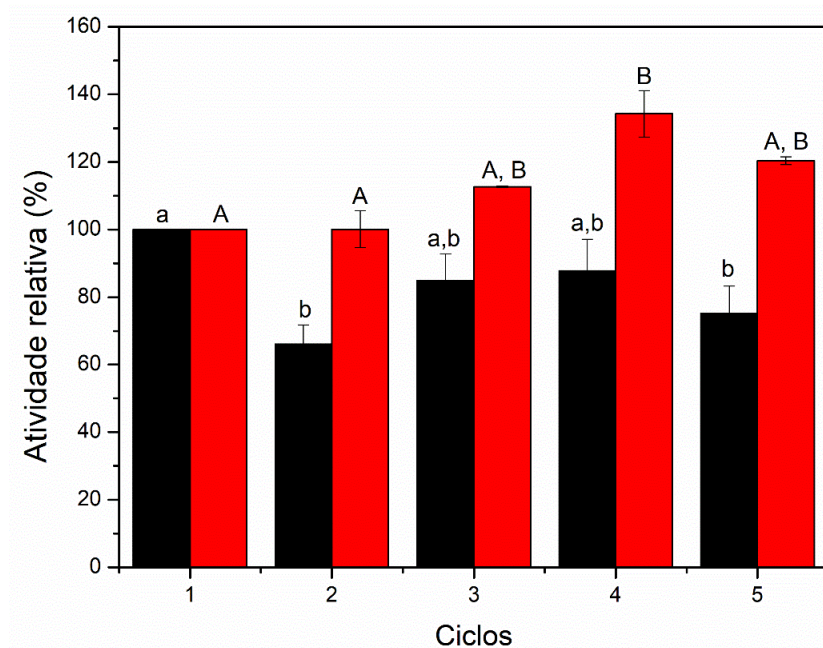
Até 90 dias, a atividade do SBAC-TLL-GA se estabilizou, apresentando redução apenas para $(69 \pm 1) \%$. A redução da atividade observada no SBAC-TLL-GA após 60 dias pode ser atribuída à alta reatividade do glutaraldeído e pela sua capacidade de polimerização, que pode levar a alterações estruturais na enzima (BARBOSA et al., 2014). Para inativar a ação do glutaraldeído, as amostras contendo glutaraldeído poderiam ser previamente reduzidas com solução de borohidreto de sódio. No entanto, esta abordagem pode comprometer a atividade da enzima imobilizada (ORREGO et al., 2018). Para este estudo, esta estratégia foi utilizada (NaBH_4 - 1 mg/mL), mas os resultados obtidos foram de biocatalisadores heterogêneos inativos.

Ambos os biocatalisadores se mostraram estáveis quando armazenados sob refrigeração. O SBAC-TLL se apresentou estável até 90 dias de armazenamento, e o SBAC-TLL-GA com aproximadamente 30 dias de armazenamento.

4.9 Estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados em ciclos sucessivos da hidrólise da triacetina

A triacetina é um substrato de relevância na indústria de biodiesel e apresenta a capacidade de refletir as condições reais de operação dos biocatalisadores. A conversão de triacetina em 1,2-diacetina é um processo importante na síntese de intermediários para produtos químicos finos. Dessa forma, a estabilidade operacional dos biocatalisadores também foi avaliada através de sucessivos ciclos da hidrólise da triacetina para investigar o possível reaproveitamento dos biocatalisadores imobilizados, totalizando cinco ciclos de 2 h, nas condições apresentadas na metodologia (seção 3.2.6.2). Este tempo resultou em uma taxa de conversão entre 10 e 15% na produção de 1,2 diacetina para cálculo da atividade enzimática. Os resultados de estabilidade operacional são apresentados na Figura 22 e foi aplicada uma análise estatística para determinar se houve diferenças significativas nas atividades obtidas em cada ciclo.

Figura 22 - Estabilidade operacional dos biocatalisadores da lipase de *T. lanuginosus* imobilizados ao longo de 5 ciclos de reutilização. Preto: SBAC-TLL; Vermelho: SBAC-TLL-GA. Os biocatalisadores imobilizados foram carregados a 5 mg/g. Letras diferentes representam valores que apresentam diferença significativa (nível de significância de 95%). Letras minúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL e letras maiúsculas representam diferenças estatísticas do SBAC-TLL-GA.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Após o segundo ciclo de operação, a preparação SBAC-TLL apresentou uma diminuição significativa na sua atividade, restando aproximadamente $(66 \pm 6) \%$ da sua atividade inicial. Após o terceiro ciclo, o biocatalisador SBAC-TLL apresentou um pequeno aumento na atividade $(85 \pm 8) \%$. No entanto, não houve diferenças significativas quando comparado aos ciclos anteriores. Esse resultado foi mantido no quarto ciclo, com atividade relativa de $(88 \pm 9) \%$. No último ciclo observa-se uma pequena variação $(75 \pm 8) \%$. No entanto, não houve diferenças significativas entre este ciclo e os ciclos 2 a 4.

Em relação ao biocatalisador SBAC-TLL-GA, este apresentou excelente desempenho, mantendo 100% de sua atividade inicial ao longo dos cinco ciclos. Esse resultado confirma a eficiência da modificação com glutaraldeído e concorda com os resultados de estabilidade térmica e eletroforese (seções 4.4 e 4.7, respectivamente). É importante mencionar que biocatalisadores altamente estáveis favorecem a sua reutilização em ciclos reacionais sucessivos, mantendo a sua atividade próxima da atividade inicial.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo mostraram que a imobilização da TLL no suporte mesoporoso calcinado SBA-15, seguida de uma pós-modificação com GA, resultou em um biocatalisador altamente ativo e estável. O processo de imobilização em suportes não calcinados e calcinados produziu elevados rendimentos e atividades recuperadas significativas. Porém, o suporte calcinado se mostrou a melhor opção por apresentar maior estabilidade térmica e melhor retenção da atividade enzimática. O tratamento com glutaraldeído foi altamente eficaz no biocatalisador imobilizado em material calcinado e resultou na melhor estabilidade térmica, ultrapassando a meia-vida da enzima solúvel em 5,1 horas. Além disso, o SBAC-TLL-GA apresentou elevada estabilidade operacional, retendo 100% de sua atividade inicial após cinco ciclos da hidrólise da triacetina. Portanto, a imobilização da TLL em suporte mesoporoso calcinado SBA-15, seguida da pós-modificação com GA, fornece uma abordagem promissora para o desenvolvimento de um biocatalisador ativo e estável que atenda ao objetivo principal das enzimas imobilizadas - a reutilização do ativo e estável biocatalisador.

Para futuras pesquisas, recomenda-se explorar a imobilização de outras enzimas utilizando o suporte SBA-15 calcinado e modificado com diferentes agentes de reticulação para verificar a generalização dos resultados obtidos com a TLL. Além disso, a investigação de outros surfactantes e modificações de superfície poderia otimizar ainda mais a estabilidade e a atividade dos biocatalisadores. A aplicação prática desses biocatalisadores em processos industriais específicos, como a produção de biodiesel e a síntese de compostos farmacêuticos, deve ser avaliada para confirmar a viabilidade comercial e os benefícios econômicos desta abordagem.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver extrusados/pellets baseados em sílica que apresentem características apropriadas para serem utilizadas como suportes, visando aplicação desses materiais em reatores de leito fixo;
- Avaliar diferentes tamanhos de partículas dos extrusados (1, 2 e 3 mm);
- Imobilizar a lipase *Eversa® Transform 2.0* produzida por *Aspergillus oryzae*, nos extrusados/pellets;
- Caracterizar os biocatalisadores obtidos através da imobilização da *Eversa® Transform 2.0*, nos extrusados/pellets quanto a atividade e estabilidade;
- Aplicar os biocatalisadores insolúveis em reações de interesse industrial, como por exemplo, na produção de sabores e aromas, na síntese de sabões e detergentes ou na remoção de gorduras em efluentes industriais.

REFERÊNCIAS

- ABELLANAS-PEREZ, Pedro; CARBALLARES, Diego; ROCHA-MARTIN, Javier; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **The effects of the chemical modification on immobilized lipase features are affected by the enzyme crowding in the support.** *Biotechnology Progress*, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 327–345, 2023a.
- ABELLANAS-PEREZ, Pedro; CARBALLARES, Diego; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; ROCHA-MARTIN, Javier. **Glutaraldehyde modification of lipases immobilized on octyl agarose beads: Roles of the support enzyme loading and chemical amination of the enzyme on the final enzyme features.** *International Journal of Biological Macromolecules*. [S. l.], v. 248, p. 125853, 2023b.
- ADRIO, Jose L.; DEMAIN, Arnold L. **Microbial enzymes: tools for biotechnological processes.** *Biomolecules*, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- AGUDELO, Natalia A.; ESCOBAR, Sindy; TEJADA, Juan C.; LÓPEZ, Betty L. **Understanding of the formation of mesocellular-like silica foam particles of nano size and its chemical surface to immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase.** *Microporous and Mesoporous Materials*, [S. l.], v. 294, p. 109948, 2020.
- ALAMSYAH, G.; ALBELS, Vania A.; SAHLAN, M.; HERMANSYAH, H. **Effect of chitosan's amino group in adsorption-crosslinking immobilization of lipase enzyme on resin to catalyze biodiesel synthesis.** *Energy Procedia*. [S. l.], v. 136, p. 47–52, 2017.
- ALCÁNTARA, Andrés R.; DOMÍNGUEZ DE MARÍA, Pablo; LITTLECHILD, Jennifer A.; SCHÜRMANN, Martin; SHELDON, Roger A.; WOHLGEMUTH, Roland. **Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry.** *ChemSusChem*, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 327–345, 2022.
- ALMEIDA, Francisco Lucas Chaves; CASTRO, Maria Paula Jiménez; TRAVÁLIA, Beatriz Medeiros; FORTE, Marcus Bruno Soares. **Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis.** *Process Biochemistry*, [S. l.], v. 110, p. 37–51, 2021.
- AN, Jing Dong; PATTERSON, Darrell Alec; MCNEIL, Steve; HOSSAIN, Md Monwar. **Immobilization of lipase on woolen fabrics: Enhanced effectiveness in stain removal.** *Biotechnology Progress*, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 806–817, 2014.
- ARANA-PEÑA, Sara; RIOS, Nathalia S.; CARBALLARES, Diego; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; LOKHA, Yuliya; GONÇALVES, Luciana R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [S. l.], v. 8, 2020a.
- ARANA-PEÑA, Sara; RIOS, Nathalia S.; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; LOKHA, Yuliya; CARBALLARES, Diego; GONÇALVES, Luciana R. B.; FERNANDEZ-

LAFUENTE, Roberto. **Coimmobilization of different lipases: Simple layer by layer enzyme spatial ordering.** International Journal of Biological Macromolecules, [S. l.], v. 145, n. 4, p. 856–864, 2020 b.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. **Lipase applications in food industry.** Indian Journal of Biotechnology, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 141–158, 2007.

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ABDUL AZIZ, A. R.; SULAIMAN, N. M. N. **The effects of catalysts in biodiesel production: A review.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 14–26, 2013.

BABAKI, Mohadese; YOUSEFI, Maryam; HABIBI, Zohreh; MOHAMMADI, Mehdi; YOUSEFI, Parisa; MOHAMMADI, Javad; BRASK, Jesper. **Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: Effect of water, t-butanol and blue silica gel contents.** Renewable Energy, [S. l.], v. 91, p. 196–206, 2016.

BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization.** RSC Advances, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014.

BARBOSA, Oveimar; TORRES, Rodrigo; ORTIZ, Claudia; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde.** Process Biochemistry, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 766–774, 2012.

BASSO, Alessandra; SERBAN, Simona. **Industrial applications of immobilized enzymes—A review.** Molecular Catalysis, [S. l.], v. 479, p. 110607, 2019.

BÉRUBÉ, F.; KALIAGUINE, S. **Calcination and thermal degradation mechanisms of triblock copolymer template in SBA-15 materials.** Microporous and Mesoporous Materials, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 469–479, 2008.

BEZERRA, Rayanne M.; MONTEIRO, Rodolpho R.C.; NETO, Davino M. Andrade; DA SILVA, Francisco F.M.; DE PAULA, Regina C.M.; DE LEMOS, Telma L.G.; FECHINE, Pierre B.A.; CORREA, Marcio A.; BOHN, Felipe; GONÇALVES, Luciana R.B.; DOS SANTOS, José C.S. **A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*.** Enzyme and Microbial Technology, [S. l.], v. 138, p. 109560, 2020.

BLUM, Helmut; BEIER, Hildburg; GROSS, Hans J. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.** Electrophoresis, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BOLIVAR, Juan M.; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to**

capitalize on the benefits of immobilization. Chemical Society Reviews, [S. l.], v. 51, n. 15, p. 6251–6290, 2022.

BOUDRANT, Joseph; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation.** Process Biochemistry, [S. l.], v. 90, p. 66–80, 2020.

BRABCOVÁ, Jana; DEMIANOVÁ, Zuzana; VONDRÁŠEK, Jiří; JÁGR, Michal; ZAREVÚCKA, Marie; PALOMO, Jose M. **Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, [S. l.], v. 98, p. 62–72, 2013.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding.** Analytical Biochemistry, [S. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BROCCA, S.; SECUNDO, F.; OSSOLA, M.; ALBERGHINA, L.; CARREA, G.; LOTTI, M. **Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes.** Protein Science, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 2312–2319, 2003.

BRUNAUER, Stephen; EMMETT, P. H.; TELLER, Edward. **Adsorption of Gases in Multimolecular Layers.** Journal of the American Chemical Society, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 309–319, 1938.

CALLEJA, G.; SANZ, R.; ARENCIBIA, A.; SANZ-PÉREZ, E. S. **Influence of drying conditions on amine-functionalized SBA-15 as adsorbent of CO₂.** Topics in Catalysis, [S. l.], v. 54, n. 1-4, p. 135–145, 2011.

CARLSSON, Nils; GUSTAFSSON, Hanna; THÖRN, Christian; OLSSON, Lisbeth; HOLMBERG, Krister; ÅKERMAN, Björn. **Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical–chemical perspective.** Advances in Colloid and Interface Science, [S. l.], v. 205, p. 339–360, 2014.

CARVALHO, Tamires; FINOTELLI, Priscilla V.; BONOMO, Renata C. F.; FRANCO, Marcelo; AMARAL, Priscilla F. F. **Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification.** Process Biochemistry, [S. l.], v. 53, p. 259–266, 2017.

CHAPARRO SOSA, Andres F.; BEDNAR, Riley M.; MEHL, Ryan A.; SCHWARTZ, Daniel K.; KAAR, Joel L. **Faster Surface Ligation Reactions Improve Immobilized Enzyme Structure and Activity.** Journal of the American Chemical Society, [S. l.], v. 143, n. 18, p. 7154–7163, 2021.

CIPOLATTI, Eliane Pereira et al. **Synthesis of lipase/silica biocatalysts through the immobilization of CALB on porous SBA-15 and their application on the resolution of pharmaceutical derivatives and on nutraceutical enrichment of natural oil.** Molecular Catalysis, [S. l.], v. 505, p. 111529, 2021.

COSTA, Isabela Oliveira; RIOS, Nathália Saraiva; LIMA, Paula Jéssyca Morais; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. **Synthesis of organic-inorganic hybrid nanoflowers of lipases from *Candida antarctica* type B (CALB) and *Thermomyces lanuginosus* (TLL): Improvement of thermal stability and reusability.** Enzyme and Microbial Technology, [S. l.], v. 163, p. 10–13, 2023.

COWAN, Don A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization.** Enzyme and Microbial Technology, [S. l.], v. 49, n. 4, p. 326–346, 2011.

DA ROCHA, Thays N.; CARBALLARES, Diego; GUIMARÃES, José R.; ROCHA-MARTIN, Javier; TARDIOLI, Paulo W.; GONÇALVES, Luciana R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Determination of immobilized lipase stability depends on the substrate and activity determination condition: Stress inactivations and optimal temperature as biocatalysts stability indicators.** Sustainable Chemistry and Pharmacy, [S. l.], v. 29, p. 100823, 2022a.

DA ROCHA, Thays N.; MORELLON-STERLLING, Roberto; ROCHA-MARTIN, Javier; BOLIVAR, Juan M.; GONÇALVES, Luciana R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Immobilization of Penicillin G Acylase on Vinyl Sulfone-Agarose: An Unexpected Effect of the Ionic Strength on the Performance of the Immobilization Process.** Molecules, [S. l.], v. 27, n. 21, p. 7587, 2022b.

DE MATTOS, Marcos Carlos; DE FONSECA, Thiago Sousa; DA SILVA, Marcos Reinaldo; DE OLIVEIRA, Maria Da Conceição Ferreira; DE LEMOS, Telma Leda Gomes; DE MARQUES, Ricardo Araújo. **Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate using lipases.** Applied Catalysis A: General, [S. l.], v. 492, n. 1, p. 76–82, 2015.

DE OLIVEIRA, André L. B. et al. **Lipases immobilized onto nanomaterials as biocatalysts in biodiesel production: Scientific context, challenges, and opportunities.** Revista Virtual de Quimica, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 875–891, 2021.

DE OLIVEIRA, Ulisses M. F.; LIMA DE MATOS, Leonardo J. B.; DE SOUZA, Maria Cristiane M.; PINHEIRO, Bruna B.; DOS SANTOS, José C. S.; GONÇALVES, Luciana R. B. **Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan.** Applied Biochemistry and Biotechnology, [S. l.], v. 184, n. 4, p. 1263–1285, 2018a. DOI: 10.1007/s12010-017-2622-1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-017-2622-1>.

DE SOUZA, Ticiane C.; FONSECA, Thiago de S.; SILVA, Juciane de S.; Lima, Paula J. M.; GIRÃO, Carlos A. C. N.; MONTEIRO, Rodolpho R. C.; ROCHA, Maria Valderez P.; DE MATTOS, Marcos C.; DOS SANTOS, José C. S.; Gonçalves, Luciana R. B. **Modulation of lipase B from *Candida antarctica* properties via covalent immobilization on eco-friendly support for enzymatic kinetic resolution of rac-indanyl acetate.** Bioprocess and Biosystems Engineering, [S. l.], v. 43, n. 12, p. 2253–2268, 2020.

DE SOUZA, Ticiane C.; DE FONSECA, Thiago S.; DA COSTA, Jessyca A.; ROCHA, Maria Valderez Ponte; DE MATTOS, Marcos Carlos; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana R. B.; DOS SANTOS, José C. S. **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, [S. l.], v. 130, p. 58–69, 2016.

DIAMANTI, Eleftheria; ARANA-PENÑA, Sara; RAMOS-CABRER, Pedro; COMINO, Natalia; CARBALLARES, Diego; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando. **Intraparticle Macromolecular Migration Alters the Structure and Function of Proteins Reversibly Immobilized on Porous Microbeads.** Advanced Materials Interfaces, [S. l.], v. 9, n. 18, 2022.

DORAN, Pauline M. **Bioprocess engineering principles.** 2 edition. Usa: Academic Press, 2012.

DOS SANTOS, José C. S.; BONAZZA, Horacio L.; DE MATOS, Leonardo J. B. L.; CARNEIRO, Elizabete A.; BARBOSA, Oveimar; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana R. B.; DE SANT'ANA, Hosiberto B.; SANTIAGO-AGUIAR, Rílvia S. **Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide.** Biotechnology Reports, [S. l.], v. 14, p. 16–26, 2017.

DOS SANTOS, Kimberle Paiva; RIOS, Nathália Saraiva; LABUS, Karolina; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. **Co-immobilization of lipase and laccase on agarose-based supports via layer-by-layer strategy: Effect of diffusional limitations.** Biochemical Engineering Journal, [S. l.], v. 185, p. 108533, 2022.

DOS SANTOS, Sandra Maria Lopes; NOGUEIRA, Karina Alexandre Barros; DE SOUZA GAMA, Marlon; LIMA, Jeann Diniz Ferreira; DA SILVA JÚNIOR, Ivanildo José; DE AZEVEDO, Diana Cristina Silva. **Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules.** Microporous and Mesoporous Materials, [S. l.], v. 180, p. 284–292, 2013.

EVANS, Robert; MARCONI, Umberto Marini Bettolo; TARAZONA, Pedro. **Capillary condensation and adsorption in cylindrical and slit-like pores.** Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, [S. l.], v. 82, n. 10, p. 1763, 1986.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. **Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 43–49, 2004.

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

FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; PALOMO, Jose M.; CABRERA, Zaida; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José M. **Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium.** *Biotechnology and Bioengineering, [S. l.]*, v. 97, n. 2, p. 242–250, 2007.

FILHO, Danielle Gonçalves; SILVA, Amanda Gonçalves; GUIDINI, Carla Zanella. **Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology, [S. l.]*, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019.

FUENTES, Manuel. PESSELA, Benevides C. C.; MAQUIESE, Jorgette V.; ORTIZ, Claudia; SEGURA, Rosa L.; PALOMO, Jose M.; ABIAN, Olga; TORRES, Rodrigo; MATEO, Cesar; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, J. M. **Reversible and Strong Immobilization of Proteins by Ionic Exchange on Supports Coated with Sulfate-Dextran.** *Biotechnology Progress, [S. l.]*, v. 20, n. 4, p. 1134–1139, 2004.

GAO, Siliang; WANG, Yujun; DIAO, Xiang; LUO, Guangsheng; DAI, Youyuan. **Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15.** *Bioresource Technology, [S. l.]*, v. 101, n. 11, p. 3830–3837, 2010.

GARCIA-GALAN, Cristina; BARBOSA, Oveimar; HERNANDEZ, Karel; SANTOS, J. C. S. Dos; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases.** *Molecules, [S. l.]*, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014.

GARCIA-GALAN, Cristina; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRIGUES, Rafael C. **Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance.** *Advanced Synthesis and Catalysis, [S. l.]*, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GASCÓN, Victoria; DÍAZ, Isabel; MÁRQUEZ-ÁLVAREZ, Carlos; BLANCO, Rosa M. **Mesoporous silicas with tunable morphology for the immobilization of laccase.** *Molecules, [S. l.]*, v. 19, n. 6, p. 7057–7071, 2014.

GODOY, César. **New Strategy for the Immobilization of Lipases on Glyoxyl–Agarose Supports: Production of Robust Biocatalysts for Natural Oil Transformation.** *International Journal of Molecular Sciences, [S. l.]*, v. 18, n. 10, p. 2130, 2017.

GUIMARÃES, Darlyson Tavares; DE OLIVEIRA BARROS, Matheus; DE ARAÚJO E SILVA, Renata; SILVA, Sarah Maria Frota; DE ALMEIDA, Jessica Silva; DE FREITAS ROSA, Morsyleide; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros; BRÍGIDA, Ana Iraidy Santa. **Superabsorbent bacterial cellulose film produced from industrial residue of cashew apple juice processing.** *International Journal of Biological Macromolecules, [S. l.]*, v. 242, p. 124405, 2023.

GUO, Qi; NA, Yingfeng; YUN, Junhua; YANG, Miaomiao; MAGOCHA, Tinashe A.; ZHU, Jingfei; YANBO, Xue; QI, Yilin; HOSSAIN; Zabed; SUN, Wenjing; QI,

Xianghui. **Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation.** Bioresource Technology, [S. l.], v. 247, p. 940–946, 2018.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C. N. **Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 171–190, 2013.

CAVALCANTI, Marcello Henrique da Silva; ALVES, Levy Bueno; DUARTE, Alfredo; MENDES, Adriano Aguiar; DA SILVA, José Maurício Schneedorf Ferreira; DA SILVEIRA, Nelson José Freitas; ESCOTE, Marcia Tsuyama; VIRTUOSO, Luciano Sindra. **Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance.** Chemical Engineering Journal, [S. l.], v. 431, p. 134128, 2022.

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

HOFMEYR, S.; MEYER, C.; WARREN, B. L. **Serum lipase should be the laboratory test of choice for suspected acute pancreatitis.** South African Journal of Surgery, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 72–75, 2014.

HOLMQUIST, Mats; CLAUSEN, Ib Groth; PATKAR, Shamkant; SVENDSEN, Allan; HULT, Karl. **Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent.** Journal of Protein Chemistry, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 217–224, 1995.

KATCHALSKI-KATZIR, Ephraim; KRAEMER, Dieter M. **Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential.** Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic, [S. l.], v. 10, n. 1–3, p. 157–176, 2000.

KIM, Moon Il; KIM, Jungbae; LEE, Jinwoo; SHIN, Sujeong; NA, Hyon Bin; HYEON, Taeghwan; PARK, Hyun Gyu; CHANG, Ho Nam. **One-dimensional crosslinked enzyme aggregates in SBA-15: Superior catalytic behavior to conventional enzyme immobilization.** Microporous and Mesoporous Materials, [S. l.], v. 111, n. 1–3, p. 18–23, 2008.

LA VARS, Sian M.; JOHNSTON, Martin R.; HAYLES, John; GASCOOKE, Jason R.; BROWN, Melissa H.; LETERME, Sophie C.; ELLIS, Amanda V. **²⁹Si{¹H} CP-MAS NMR comparison and ATR-FTIR spectroscopic analysis of the diatoms *Chaetoceros muelleri* and *Thalassiosira pseudonana* grown at different salinities.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, [S. l.], v. 405, n. 10, p. 3359–3365, 2013.

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

LAGE, Flávia A. P.; BASSI, Jaqueline J.; CORRADINI, Maria C. C.; TODERO, Larissa M.; LUIZ, Jaine H. H.; MENDES, Adriano A. **Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system.** *Enzyme and Microbial Technology*, [S. l.], v. 84, p. 56–67, 2016.

LEE, Jinwoo et al. **Simple synthesis of hierarchically ordered mesocellular mesoporous silica materials hosting crosslinked enzyme aggregates.** *Small*, [S. l.], v. 1, n. 7, p. 744–753, 2005.

LIMA, Paula Jéssyca Moraes; DA SILVA, Rhonyele Maciel; NETO, Carlos Alberto Chaves Girão; GOMES E SILVA, Natan Câmara; SOUZA, José Erick da Silva; NUNES, Yale Luck; SOUSA DOS SANTOS, José Cleiton. **An overview on the conversion of glycerol to value-added industrial products via chemical and biochemical routes.** *Biotechnology and Applied Biochemistry*, [S. l.], v. 69, n. 6, p. 2794–2818, 2022.

LOKHA, Yuliya; ARANA-PENÑA, Sara; RIOS, Nathalia S.; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; GONÇALVES, Luciana R. B.; LOPEZ-GALLEGO, Fernando; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions.** *Enzyme and Microbial Technology*, [S. l.], v. 133, p. 109461, 2020.

MAGHRABY, Yasmin R.; EL-SHABASY, Rehan M.; IBRAHIM, Ahmed H.; AZZAZY, Hassan Mohamed El Said. **Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications.** *ACS Omega*, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 2023.

MAGNER, Edmond. **Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials.** *Chemical Society Reviews*, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6213, 2013.

MALDONADO, Rafael Resende; MACEDO, Gabriela Alves; RODRIGUES, Maria Isabel. **Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By- Products.** *International Journal of Applied Science and Technology*, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 108–115, 2014.

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

MATEO, Cesar; PALOMO, Jose M.; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria; GUISAN, Jose M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** *Enzyme and Microbial Technology*, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, Adriano A.; GIORDANO, Roberto C.; GIORDANO, Raquel De L. C.; DE CASTRO, Heizir F. **Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the**

biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 109–115, 2011.

MONTEIRO, Marcos Roberto; KUGELMEIER, Cristie Luis; PINHEIRO, Rafael Sanaïotte; BATALLA, Mario Otávio; DA SILVA CÉSAR, Aldara. **Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [S. l.], v. 88, p. 109–122, 2018.

MONTEIRO, Rodolpho R. C.; LIMA, Paula J. M.; PINHEIRO, Bruna B.; FREIRE, Tiago M.; DUTRA, Lillian M. U.; FECHINE, Pierre B. A.; GONÇALVES, Luciana R. B.; DE SOUZA, Maria C. M.; DOS SANTOS, José C. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles.** *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 20, n. 16, p. 4018, 2019.

OJEDA-LÓPEZ, Reyna; PÉREZ-HERMOSILLO, Isaac J.; MARCOS ESPARZA-SCHULZ, J.; CERVANTES-URIBE, Adrián; DOMÍNGUEZ-ORTIZ, Armando. **SBA-15 materials: calcination temperature influence on textural properties and total silanol ratio.** *Adsorption*, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 659–669, 2015.

ORREGO, Alejandro H.; ROMERO-FERNÁNDEZ, Maria; MILLÁN-LINARES, María Del Carmen; YUST, María Del Mar; GUISÁN, José M.; ROCHA-MARTIN, Javier. **Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment on aldehyde-supports: 2-picoline borane as an alternative reducing agent.** *Catalysts*, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 333, 2018.

PALOMO, José M.; MUOZ, Gloria; FERNÁNDEZ-LORENTE, Gloria; MATEO, Cesar; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José M. **Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, [S. l.], v. 19, n. 20, p. 279–286, 2002.

PENG, Lifeng; XU, Xuebing; MU, Huiling; HØY, Carl Erik; ADLER-NISSEN, Jens. **Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization using response surface methodology.** *Enzyme and Microbial Technology*, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 523–532, 2002.

PETTERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; COUCH, Gregory S.; GREENBLATT, Daniel M.; MENG, Elaine C.; FERRIN, Thomas E. **UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis.** *Journal of Computational Chemistry*, [S. l.], v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PINHEIRO, Bruna B.; RIOS, Nathalia S.; RODRÍGUEZ AGUADO, Elena; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; FREIRE, Tiago M.; FECHINE, Pierre B. A.; DOS SANTOS, José C. S.; GONÇALVES, Luciana R. B. **Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*.** *International Journal of Biological Macromolecules*, [S. l.], v. 130, p. 798–809, 2019.

PINHEIRO, Bruna B.; SAIBI, Sabrina; HAROUNE, Lounès; RIOS, Nathália Saraiva; GONÇALVES, Luciana R. B.; CABANA, Hubert. **Genipin and glutaraldehyde based laccase two-layers immobilization with improved properties: New biocatalysts with high potential for enzymatic removal of trace organic contaminants.** *Enzyme and Microbial Technology*, [S. l.], v. 169, p. 110261, 2023.

QIAN, Junqing; HUANG, Aomei; ZHU, Hanxiao; DING, Jing; ZHANG, Wei; CHEN, Yan. **Immobilization of lipase on silica nanoparticles by adsorption followed by glutaraldehyde cross-linking.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 25–38, 2023.

RAFIEE, F.; REZAEI, M. **Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 179, p. 170–195, 2021.

RASHID, Rubaya; AFROZE, Farhana; AHMED, Saika; SHAH MIRAN, Muhammed; BIN, Abu; SUSAN, Hasan. **Control of the Porosity and Morphology of Ordered Mesoporous Silica by Varying Calcination Conditions.** *Materials Today: Proceedings*, [S. l.], v. 15, p. 546–554, 2019.

RAVIKOVITCH, Peter I.; NEIMARK, Alexander V. **Characterization of Micro- and Mesoporosity in SBA-15 Materials from Adsorption Data by the NLDFT Method.** *The Journal of Physical Chemistry B*, [S. l.], v. 105, n. 29, p. 6817–6823, 2001.

REIS, Borges; LUZIA, Carla; YVAY, Emerson; SOUSA, Almeida De; FRANÇA, Juliana De; CASEMIRO, Ravena. **Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities.** *Química Nova*, [S. l.], v. 42, n. 7, p. 768–783, 2019.

RIOS, Nathalia S.; PINHEIRO, Maisa P.; DOS SANTOS, José Cleiton S.; FONSECA, Thiago de S.; LIMA, Lara D.; DE MATTOS, Marcos C.; FREIRE, Denise M.G.; DA SILVA JÚNIOR, Ivanildo J.; RODRÍGUEZ-AGUADO, Elena; GONÇALVES, Luciana R.B. **Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R, S)-Phenylethyl acetate.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, [S. l.], v. 133, p. 246–258, 2016.

RIOS, Nathalia S.; MENDEZ-SANCHEZ, Carmen; ARANA-PENÑA, Sara; RUEDA, Nazzoly; ORTIZ, Claudia; GONÇALVES, Luciana R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on glyoxyl-octyl-agarose beads: Improved stability and reusability.** *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, [S. l.], v. 1867, n. 9, p. 741–747, 2019a.

RIOS, Nathalia S.; MORAIS, Eva Gomes; GALVÃO, Wesley Dos Santos; ANDRADE NETO; Davino M.; DOS SANTOS, José Cleiton Sousa; BOHN, Felipe; CORREA, Marcio A.; FECHINE, Pierre Basílio Almeida; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. **Further stabilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl coated nanoparticles via chemical modification with bifunctional agents.** *International Journal of Biological Macromolecules*, [S. l.], v. 141, p. 313–324, 2019b.

RIOS, Nathália Saraiva; HONORATO, Talita Lopes; CECILIA, Juan Antonio; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, Enrique; COELHO, Maria Alice Zarur; DA SILVA JÚNIOR, Ivanildo José; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. **Applicability of mesoporous silica type SBA-15 as feasible support for the immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase and *Candida antarctica* lipase B.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 1013–1021, 2022.

RIOS, Nathalia Saraiva; PINHEIRO, Maisa Pessoa; LIMA, Magno Luís Bezerra; FREIRE, Denise Maria Guimarães; DA SILVA, Ivanildo José; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, Enrique; DE SANT'ANA, Hosiberto Batista; MACEDO, André Casimiro; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. **Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as model reactions.** Chemical Engineering Research and Design, [S. l.], v. 129, p. 12–24, 2018.

RODRIGUES, Rafael C. et al. **Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*.** Process Biochemistry, [S. l.], v. 44, n. 6, p. 641–646, 2009.

RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; CARBALLARES, Diego; MORELLON-STERLING, Roberto; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies.** Biotechnology Advances, [S. l.], v. 52, p. 107821, 2021.

RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes.** Advanced Synthesis and Catalysis, [S. l.], v. 353, n. 13, p. 2216–2238, 2011.

RODRIGUES, Rafael C.; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; TORRES, Rodrigo; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization.** Chemical Society Reviews, [S. l.], v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, Rafael C.; VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; DOS SANTOS, José C. S.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; ALCANTARA, Andres R.; BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions.** Biotechnology Advances, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.

ROUQUEROL, Jean; ROUQUEROL, Françoise; LLEWELLYN, Philip; MAURIN, Guillaume; SING, Kenneth S. W. **Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications.** 2. ed. Amsterdã: Elsevier, p. 646, 2014.

ROWE, Helen D. **Biotechnology in the textile/clothing industry: a review.** Journal of Consumer Studies & Home Economics, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 53–61, 1999.

RUEDA, Nazzoly; DOS SANTOS, Jose C. S.; ORTIZ, Claudia; TORRES, Rodrigo; BARBOSA, Oveimar; RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel;

- FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities**. Chemical Record, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 1436–1455, 2016.
- SADANA, AJIT; HENLEY, JAMES P. **Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes**. Annals of the New York Academy of Sciences, [S. l.], v. 501, n. 1, p. 73–79, 1987.
- SAE-LEAW, Thanasak; BENJAKUL, Soottawat. **Lipase from liver of seabass (*Lates calcarifer*): Characteristics and the use for defatting of fish skin**. Food Chemistry, [S. l.], v. 240, p. 9–15, 2018.
- SANTOS, Jose Cleiton Souza dos S. Dos; BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Angel; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes**. ChemCatChem, [S. l.], v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015.
- SARMAH, Nipon; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. **Recent advances on sources and industrial applications of lipases**. Biotechnology Progress, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.
- SERRA, E.; ALFREDSSON, V.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I. **A comprehensive strategy for the immobilization of lipase in ordered mesoporous materials**. Elsevier. [S. l.], v. 174, p. 369–372, 2018.
- SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. **Biotechnological approach of microbial lipase: A review**. Biotechnology, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 23–40, 2011. DOI: 10.3923/biotech.2011.23.40.
- SHELDON, Roger A. **Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts**. Organic Process Research and Development, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 213–223, 2011. DOI: 10.1021/op100289f.
- SHELDON, Roger A.; WOODLEY, John M. **Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry**. Chemical Reviews, [S. l.], v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.
- SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies**. Biochemical Engineering Journal, [S. l.], v. 60, p. 16–24, 2012.
- SILVA, João Matheus Fonteles; DOS SANTOS, Kimberle Paiva; DOS SANTOS, Everaldo Silvino; RIOS, Nathália Saraiva; GONÇALVES, Luciana Rocha Barros. **Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on a new hydrophobic support (Streamline phenyl™): Strategies to improve stability and reusability**. Enzyme and Microbial Technology, [S. l.], v. 163, p. 110166, 2023.
- SILVA, João Matheus Fonteles. **Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase on Streamline™ Phenyl Hydrophobic Interaction Resin**. Fortaleza: Universidade

Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, 2022. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará.

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. **Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity**. Pure and Applied Chemistry, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 603–619, 1985.

SINGH, Suren; MADLALA, Andreas M.; PRIOR, Bernard A. ***Thermomyces lanuginosus*: Properties of strains and their hemicellulases**. FEMS Microbiology Reviews, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 3–16, 2003.

TAMBE, A.; VYASARAYANI, R.; DATLA, A.; PONRATHNAM, S.; DEMNEROVA, K. **Macroporous Poly (Vinyl Acetate-Co-Divinyl Benzene) Copolymer Beads as Adsorptive Support for the Direct Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B**. Enzyme Engineering, [S. l.], v. 4, n. 130, p. 2, 2015.

THOMMES, Matthias; KANEKO, Katsumi; NEIMARK, Alexander V.; OLIVIER, James P.; RODRIGUEZ-REINOSO, Francisco; ROUQUEROL, Jean; SING, Kenneth S. W. **Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)**. Pure and Applied Chemistry, [S. l.], v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.

VALÉRIO, Alexsandra; ROVANI, Suzimara; TREICHEL, Helen; DE OLIVEIRA, Débora; OLIVEIRA, J. Vladimir. **Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems**. Bioprocess and Biosystems Engineering, [S. l.], v. 33, n. 7, p. 805–812, 2010.

VAN DER VOORT, Pascal; GILLIS-D’HAMERS, Iwan; VRANCKEN, Karl C.; VANSANT, Etienne F. **Effect of porosity on the distribution and reactivity of hydroxyl groups on the surface of silica gel**. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, [S. l.], v. 87, n. 24, p. 3899, 1991.

VANSANT, E. F.; VOORT, P. Van Der; VRANCKEN, K. C. **Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface**. Studies in Surface Science and Catalysis, 1st Edition. v. 93, p. 3-556.

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi; FEITOSA, Judith Pessoa Andrade; DA GAMA, Francisco Miguel Portela; MORAIS, João Paulo Saraiva; ANDRADE, Fábila Karine; DE SOUZA FILHO, Men de Sá Moreira; ROSA, Morsyleide de Freitas. **Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features**. Carbohydrate Polymers, [S. l.], v. 155, p. 425–431, 2017.

VILARRASA-GARCÍA, E.; CECILIA, J. A.; SANTOS, S. M. L.; CAVALCANTE, C. L.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, J.; AZEVEDO, D. C. S.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E. **CO₂ adsorption on APTES functionalized mesocellular foams obtained from mesoporous silicas**. Microporous and Mesoporous Materials, [S. l.], v. 187, p. 125–134, 2014.

VILARRASA-GARCIA, E.; MOYA, E. M. Ortigosa; CECILIA, J. A.; CAVALCANTE, C. L.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, J.; AZEVEDO, D. C. S.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E. **CO₂ adsorption on amine modified mesoporous silicas: Effect of the progressive disorder of the honeycomb arrangement.** Microporous and Mesoporous Materials, [S. l.], v. 209, p. 172–183, 2015.

WANG, Lifeng; YANG, Ralph T. **Increasing selective CO₂ adsorption on amine-grafted SBA-15 by increasing silanol density.** Journal of Physical Chemistry C, [S. l.], v. 115, p. 21264–21272, n. 43, 2011.

WEETALL, Howard. H. **Immobilized enzymes: analytical applications.** Analytical Chemistry, [S. l.], v. 46, n. 7, p. 602–615, 1974.

WYSOCKI, Antoni; ŁAWRYŃCZUK, Maciej. **Predictive control of a multivariable neutralisation process using elman neural networks.** Advances in Intelligent Systems and Computing, [S. l.], v. 350, p. 335–344, 2015.

YAACOB, Norhayati; MOHAMAD ALI, Mohd Shukuri; SALLEH, Abu Bakar; RAHMAN, Raja Noor Zaliha Raja Abdul; LEOW, Adam Thean Chor. **Toluene promotes lid 2 interfacial activation of cold active solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain AMS8.** Journal of Molecular Graphics and Modelling, [S. l.], v. 68, p. 224–235, 2016.

YUAN, Min Hao; WANG, Lifeng; YANG, Ralph T. **Glow discharge plasma-assisted template removal of SBA-15 at ambient temperature for high surface area, high silanol density, and enhanced CO₂ adsorption capacity.** Langmuir, [S. l.], v. 30, n. 27, p. 8124–8130, 2014.

YÜCEL, Yasin. **Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 39–44, 2012.

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

ZHANG, He; SUN, Junming; MA, Ding; BAO, Xinhe; KLEIN-HOFFMANN, Achim; WEINBERG, Giesela; SU, Dangsheng; SCHLÖGL, Robert. **Unusual mesoporous SBA-15 with parallel channels running along the short axis.** Journal of the American Chemical Society, [S. l.], v. 126, n. 24, p. 7440–7441, 2004.

ZHANG, X. L.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. **Biodiesel production from heterotrophic microalgae through transesterification and nanotechnology application in the production.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, [S. l.], v. 26, p. 216–223, 2013.

ZHAO, Dongyuan; FENG, Jianglin; HUO, Qisheng; MELOSH, Nicholas; FREDRICKSON, Glenn H.; CHMELKA, Bradley F.; STUCKY, Galen D. **Triblock**

copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. Science, [S. l.], v. 279, n. 5350, p. 548-552, 1998.

ZHURAVLEV, L. T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, [S. l.], v. 173, n. 1-3, p. 1-38, 2000.