



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

THAYS NOGUEIRA DA ROCHA

**Desenvolvimento e otimização de biocatalisadores imobilizados
por modificação química de suportes ativados: Estudo da
estabilidade e atividade enzimática**

**FORTALEZA-CE
2023**

THAYS NOGUEIRA DA ROCHA

**Desenvolvimento e otimização de biocatalisadores imobilizados
por modificação química de suportes ativados: Estudo da
estabilidade e atividade enzimática**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA-CE

2023

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)

R577d Rocha, Thays Nogueira da.

Desenvolvimento e otimização de biocatalisadores imobilizados por modificação química de suportes ativados: Estudo da estabilidade e atividade enzimática / Thays Nogueira da Rocha. – 2023.
184 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2023.

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

Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Enzimas. 2. Protocolo de imobilização. 3. Divinilsulfona. 4. Estabilidade. 5. Atividade enzimática. I.
Título.

CDD 660

THAYS NOGUEIRA DA ROCHA

Desenvolvimento e otimização de biocatalisadores imobilizados por modificação química de suportes ativados: Estudo da estabilidade e atividade enzimática

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

Prof. Dr. Enrique Vilarrasa Garcia

Prof^a Dr^a Maria Alexsandra de Souza Rios

Prof. Dr. Norberto de Kassio Vieira Monteiro

Prof^a Dr^a Maria Cristiane Martins de Sousa

*Ao meu filho Benício e ao meu esposo Leo,
que foram meus alicerces para que eu pudesse
trilhar essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ser presença viva em todos os momentos da minha vida. Por ter me dado forças para que eu pudesse continuar persistindo na conquista dos meus sonhos.

Ao meu filho Benício que com sua doçura, pureza, carinho e alegria me motiva todos os dias a ser melhor. Não há em mim nenhum traço da Thays anterior a tua chegada. Você, meu Ben, é minha fonte de inspiração. És o meu sonho realizado.

Ao meu esposo Leo que desde 2006 trilha comigo essa jornada maravilhosa que é a vida. És o meu apoio, meu amigo, meu conselheiro e amor. Sua integridade, honestidade e lealdade são características que me inspiram. Cada momento vivido é um bálsamo que deve ser celebrado cotidianamente. Que sorte por ter encontrado minha tão almejada “Felicidade Clandestina”.

Aos meus pais que sempre me ensinaram que a vida deve ser trilhada, acima de tudo, com humildade. Meus primeiros exemplos de luta, abdicação, dedicação, mas principalmente, de fé. Desde muito pequena aprendi a ter coragem e a jamais desistir diante dos obstáculos. A vocês todo meu amor e carinho.

A minha irmã, minha amiga, exemplo de profissional, íntegra e dedicada em tudo que faz. Me proporcionou uma das melhores alegrias da vida, quando eu estava do outro lado do oceano, desempenhando parte desse trabalho: minha filha do coração Elisa. Todo o meu amor, carinho e orgulho da mulher que você se tornou.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos, pela orientação desse trabalho ao qual tenho muito orgulho. Agradeço imensamente por ter confiado no meu trabalho, mas principalmente por ter me permitido cursar parte do meu doutorado em Madrid. Saiba que sua abdicação e dedicação, me proporcionaram crescer como profissional. És um exemplo de pesquisador a ser seguido, por sua perseverança e dedicação ao trabalho.

A minha corientadora Profa. Dra Luciana Rocha Barros Gonçalves, a quem tenho profundo respeito e admiração. Sua gentileza durante esses quatro anos, seus ensinamentos e amor pela pesquisa foram em vários momentos, catalisadores para que eu pudesse seguir com essa pesquisa. Agradeço pela partilha do seu conhecimento e dedicação na construção desse trabalho, que foi um divisor de águas na minha carreira profissional.

Agradezco a Roberto Fernandez Lafuente por guiarme en parte de esta investigación. Sus enseñanzas, su cordialidad y paciencia en todo momento me hicieron reflexionar sobre el investigador que pretendo ser. Su dedicación y amor por la investigación fueron una fuente de inspiración que sin duda llevaré en mi camino profesional.

Ao meu amigo Renato Guimarães, que conheci durante minha estadia no ICP, pelos momentos de descontração, boas risadas, conselhos, mas principalmente, por ter sido como um professor, no assunto imobilização. Eu digo sempre que você foi como um irmão, e grande parte do que aprendi para desenvolver essa pesquisa, devo também a você. Obrigada meu amigo.

Aos meus amigos Carla e Alexandre que considero parte da família. Agradeço por todo apoio e carinho durante minha estadia em Madrid. Vocês tornaram tudo mais leve.

A los compañeros de laboratorio Diego Carballares y Roberto Morellon por los momentos de aprendizaje que fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química – DEQ/UFC, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso de Doutorado.

Aos amigos do GPBio, Paulinha, Laiza, Ravena, Carlos, Rebeca, Eddie, Carlinha, Valdelice, Ana Paula e demais bolsistas e integrantes, que embora minha estadia tenha sido curta, me acolheram com muito carinho. Agradeço por ter trabalhado com pessoas gentis, alegres e de uma competência sem tamanho. Sentirei falta dos cafés movidos à alegria e boas risadas.

Aos colegas de curso Rafael Fernandes e Paulo Gonçalves na elaboração das análises e caracterizações das amostras do trabalho e pelo apoio que foi fundamental na elaboração dessa pesquisa.

Ao IFCE e amigos dessa instituição na qual tenho grande orgulho em fazer parte, em especial ao professor Roberto que foi meu suporte no direcionamento das disciplinas de química, permitindo que eu me dedicasse no desenvolvimento da minha pesquisa de doutorado. Todo meu respeito, carinho e gratidão.

À Universidad Autonoma de Madrid, e ao Instituto de Catálisis y Petroleoquímica.

À Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Engenharia Química.

A FUNCAP, CAPES e CNPq pela bolsa de pesquisa formentada.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, einda mais alegre ainda no meio da tristeza! Só assim de repente, na horinha em que se quer, de propósito — por coragem (ROSA, João Guimarães).

RESUMO

A imobilização enzimática é uma estratégia que objetiva proporcionar melhorias em algumas características como estabilidade, seletividade e especificidade bem como recuperação e reutilização de enzimas. Com isso, este trabalho visa o desenvolvimento e otimização de biocatalisadores através de protocolos de imobilização mediante a modificação química de suportes pré existentes. Os suportes ativados com divinilsulfona (DVS) mostraram-se úteis para a estabilização de enzimas via ligação covalente multipontual, devido à moderada hidrofobicidade dos grupos vinilsulfona que condiciona a formação de um suporte heterofuncional, capaz de interagir com a proteína por adsorção física ou através da ligação covalente. A enzima penicilina G acilase (PGA) de *Escherichia coli*, foi imobilizada em suportes heterofuncionais de natureza química distinta, tendo o grupamento vinilsulfona como parte constituinte desses. Para essa finalidade, foi realizada a otimização das etapas referentes ao processo de imobilização a fim de melhorar a estabilidade e atividade enzimática dos biocatalisadores produzidos. Mediante o uso das diferentes variáveis relacionadas às etapas de imobilização, a PGA apresentou estabilidade semelhante ao da gioxil-agarose-PGA, considerado um dos biocatalisadores mais estáveis dessa enzima. Ademais desse trabalho, foi realizado o estudo da estabilidade das lipases *Candida antarctica* (formas A e B), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Candida rugosa* (CRL), imobilizadas através de diferentes protocolos, na hidrólise de substratos de natureza distinta, através do condicionamento dos biocatalisadores à inativações de estresse. A possibilidade de mudança na estabilidade bem como especificidade enzimática são fortemente influenciadas pelas condições experimentais nas quais estarão inseridas. Por fim, os biocatalisadores da lipase A de *Candida antarctica* foram investigados através da aplicação desses na síntese do aroma butirato de geranila, via rota enzimática. A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e a análise por Fluorescência de Raios X (XRF) foram utilizadas a fim de avaliar a cobertura dos suportes e das estruturas imobilizadas como também a composição química dessas amostras.

Palavras-chave: Enzimas. Protocolo de imobilização. Divinilsulfona. Estabilidade. Atividade enzimática.

ABSTRACT

Enzyme immobilization is a strategy that aims to provide improvements in some characteristics such as stability, selectivity and specificity, as well as recovery and reuse of enzymes. With this, this work aims at the development and optimization of biocatalysts through immobilization protocols through the chemical modification of pre-existing supports. The supports activated with divinylsulfone (DVS) proved to be useful for the stabilization of enzymes via multipoint covalent bonding, due to the moderate hydrophobicity of the vinylsulfone groups, which conditions the formation of a heterofunctional support, capable of interacting with the protein by physical adsorption or through the covalent bond. The enzyme penicillin G acylase (PGA) from *Escherichia coli* was immobilized on heterofunctional supports of different chemical nature, with the vinylsulfone group as a constituent part of these. For this purpose, the steps related to the immobilization process were optimized in order to improve the stability and enzymatic activity of the produced biocatalysts. Through the use of the different variables related to the immobilization steps, PGA showed stability similar to that of glyoxyl-agarose-PGA, considered one of the most stable biocatalysts of this enzyme. In addition to this work, a study was carried out on the stability of the lipases *Candida antarctica* (forms A and B), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) and *Candida rugosa* (CRL), immobilized through different protocols, in the hydrolysis of substrates of different nature, through conditioning from biocatalysts to stress inactivations. The possibility of change in stability as well as enzymatic specificity are strongly influenced by the experimental conditions in which they will be inserted. Finally, the lipase A biocatalysts of *Candida antarctica* were investigated through their application in the synthesis of geranyl butyrate aroma, via the enzymatic route. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-Ray Fluorescence (XRF) analysis were used to evaluate the coverage of supports and immobilized structures as well as the chemical composition of these samples.

Keywords: Enzymes. Immobilization protocol. Divinylsulfone. Stability. Enzymatic activity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1 Estrutura da enzima lipase B de <i>Candida antarctica</i> , código <i>Protein Data Bank</i> (PDB):4K5Q.....	36
Figura 2.2 Estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida rugosa</i>	37
Figura 2.3 Equilíbrio conformacional das lipases.....	38
Figura 2.4 Estrutura tridimensional da penicilina G acilase de <i>Escherichia coli</i>	39
Figura 2.5 Mecanismo de reação da lipase A de <i>Candida antarctica</i>	40
Figura 2.6 Protocolos de imobilização enzimática.....	43
Figura 2.7 Efeito da força iônica no equilíbrio conformacional de lipases imobilizadas via ativação interfacial ou utilizando suportes convencionais.....	44
Figura 2.8 Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.....	46
Figura 2.9 Estrutura química da agarose.....	49
Figura 2.10 Imobilização de um agregado bimolecular.....	51

Capítulo 3

Esquema 3.1 Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi estudada de acordo com os pH's 7,0, 8,0 e 9,0. O pH de incubação em 9,0, tempo de incubação por 3 horas e o bloqueio com glicina 2 mol/L, permaneceram os mesmos para todos os biocatalisadores.....	71
Esquema 3.2 Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi realizada nos pH's 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. O tempo de incubação de 3 horas e bloqueio com glicina 2 mol/L permaneceram os mesmos para todos os biocatalisadores.....	73
Esquema 3.3 Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi realizada em pH 10,0, observando os efeitos dos tempos de 1, 3, 5,	

24, 48 e 72 horas nas atividades dos biocatalisadores. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.....	75
Esquema 3.4 Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi realizada por 3 horas em pH 10,0, tendo como estudo diferentes agentes de bloqueio.....	77
Figura 3.1 Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em vinil sulfona agarose em diferentes valores de pH. (A) Imobilização em suporte de glioxilagarose em pH 10,0; (B): imobilização em agarose-VS a pH 7,0; (C) imobilização em agarose-VS a pH 8,0; (D) imobilização em agarose-VS a pH 9,0; (E) imobilização em VS-agarose a pH 10,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.....	63
Figura 3.2 Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em vinil sulfona agarose em diferentes valores de pH na proporção de 1 g de suporte para 3 mL de solução enzimática. (A) imobilização em suporte de glioxilagarose; (B) imobilização em VS-agarose a pH 7,0; (C) imobilização em VS-agarose a pH 8,0; (D) imobilização em VS-agarose a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.....	64
Figura 3.3 Cursos de inativação térmica de PGA immobilizado em diferentes valores de pH. A enzima foi immobilizada, na proporção de 1 g de suporte para 3 mL de solução enzimática. A incubação foi realizada em carbonato de sódio 50 mM a pH 9,0 durante 3 h e bloqueada com glicina 2 M a pH 8,0 durante 48 h. Círculos vazios com linha tracejada: glioxilagarose-PGA. Triângulos cheios com linha sólida: imobilização em pH 7,0. Quadrados inteiros com linha sólida: imobilização em pH 8,0. Círculos completos com linha sólida: imobilização em pH 9,0. Outras especificações são descritas nos Métodos.....	65
Figura 3.4 Cursos de imobilização em glioxil agarose (A) e em vinil sulfona agarose em diferentes concentrações de fosfato de sódio em pH 8,0, 25 °C. (B) 25mM; (C) 250 mM; (D) 500 mM; (E) 1 M. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.....	66
Figura 3.5 Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em glioxil agarose (A) e em vinil sulfona agarose em diferentes concentrações de cloreto de sódio a pH 8,0, 25 °C. (B) 500 mM; (C) 1 M. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão	

de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.....67

Figura 3.6 Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em gioxil agarose (A) e em vinil sulfona agarose em diferentes concentrações de sulfato de sódio a pH 8,0, 25 °C. (B) 100 mM; (C) 250 mM; (D) 500 mM; (E) 1 M; (F) 2 M. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.....68

Figura 3.7 Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em gioxilagarose (A) e em vinil sulfona em sulfato de sódio 1 M a 25 °C em diferentes valores de pH. (B) pH a 7,0; (C) pH a 8,0; (D) pH a 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.....69

Figura 3.8 Cursos de inativação térmica de PGA imobilizado em VS-agarose em diferentes valores de pH usando sulfato de sódio 1 mol/L em comparação com a enzima imobilizada em gioxil agarose. Círculos vazios com linha tracejada: gioxilagarose. Triângulos cheios com linha contínua: a imobilização em agarose-VS foi realizada em pH 7,0. Quadrados completos com linha sólida: a imobilização foi realizada em pH 8,0. Círculos completos com linha contínua: a imobilização foi realizada em pH 9,0. Outras especificações são descritas nos Métodos.....72

Figura 3.9 Cursos de inativação térmica de PGA imobilizado em pH 7,0 em sulfato de sódio 1 mol/L e incubado em diferentes valores de pH (em comparação com a enzima imobilizada em gioxilagarose. O tempo de incubação foi de 3 h e os biocatalisadores foram bloqueados com glicina 2 mol/L. Vazio círculos com linha tracejada: gioxil agarose-PGA. Triângulos completos com linha sólida: fosfato de sódio a pH 7,0. Quadrados completos com linha sólida: fosfato de sódio a pH 8,0. Círculos completos com linha sólida: carbonato de sódio a pH 9,0. Losango completos com sólido linha: carbonato de sódio em pH 10,0. Outras especificações estão descritas nos Métodos.....74

Figura 3.10 Cursos de inativação térmica da PGA imobilizada em pH 7 em sulfato de sódio 1 M e incubada a pH 10,0 por tempos diferentes, em comparação com a enzima imobilizada em gioxilagarose. O biocatalisador foi bloqueado com glicina 2 M. Círculos vazios com linha tracejada: gioxilagarose. Triângulos vazios com linha sólida: 1 h. Círculos completos com linha sólida: 3 h. Quadrados completos com linha contínua: 5 h. Quadrados vazios com linha sólida: 24 h. Losango completo com linha sólida: 48 h. Triângulos completos com linha contínua: 72 h. Outras especificações são descritas nos Métodos.....76

Figura 3.11 Efeito de diferentes agentes bloqueadores na estabilidade da enzima penicilina G

acilase imobilizada em alta força iônica em vinil sulfona agarose. A imobilização foi realizada em fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e a incubação a pH 10,0. Círculos vazios com linha tracejada: glioxilagarose como referência. Círculo completo com linha sólida: etanolamina. Quadrados completos com linha contínua: glicina. Quadrados vazios com linha sólida: β -mercaptoetanol. Losango completo com linha sólida: cisteína. Triângulo cheio com linha sólida: controle sem agente bloqueador como referência. Triângulos vazios com linha sólida: glicose. Losangos vazios com linha sólida: etilenodiamina. Círculos vazios com linha sólida: ácido aspártico. Outras especificações são descritas nos Métodos.....**78**

Capítulo 4

Esquema 4.1 Estratégia de imobilização de PGA em grânulos de agarose MANAE-vinilsulfona (VS) heterofuncionais. A PGA não pode ser imobilizada diretamente em suportes monofuncionais VS-agarose e MANAE-agarose.....84

Esquema 4.2 Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi estudada mediante os pH's 7,0 e 9,0. A incubação foi realizada em pH 8,0 por 3 horas. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.....92

Esquema 4.3 Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi analisada mediante pH's 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 por 3 horas. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.....95

Esquema 4.4 Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0, incubação em pH 10, tendo como estudo os tempos de 1, 3, 5, 24, 48 e 72 horas. A incubação foi realizada em pH 8,0 por 3 horas. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.....97

Esquema 4.5

Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em 7,0. A incubação foi realizada em pH 10,0 por 5 horas. O bloqueio foi realizado com glicina, etanolamina, cisteína, aspártico, etilenodiamina, glicose e β -mercaptoetanol, 2 mol/L.....99

Figura 4.1 Efeito do pH nos cursos de imobilização de PGA em agarose-VS a 25 °C usando 5 mM do tampão correspondente. Os dados são apresentados como atividade residual em %, considerando 100% da atividade inicial. (A) Acetato de sódio a pH 5,0, (B) fosfato de sódio a pH 7,0 e (C) carbonato de sódio a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos vermelhos: suspensão. Quadrados azuis: sobrenadante.....88

Figura 4.2 Efeito do pH nos cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em esferas de agarose-MANAE a 25 °C em 5 mM do tampão correspondente. Os dados são apresentados como atividade residual em %, considerando 100% da atividade inicial. (A) Acetato de sódio a pH 5,0, (B) fosfato de sódio a pH 7,0 e (C) carbonato de sódio a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos vermelhos: suspensão. Quadrados azuis: sobrenadante. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.....89

Figura 4.3 Efeito do valor do pH nos cursos de imobilização de PGA em agarose-MANAE-VS a 25 °C em 5 mM do tampão indicado. Os dados são

apresentados como atividade residual em %, considerando 100% da atividade inicial. (A) Fosfato de sódio a pH 7,0 e (B) carbonato de sódio a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência (0,25 mg/mL). Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha contínua: sobrenadante. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.91

Figura 4.4 Cursos de inativação térmica de PGA immobilizado em agarose-MANAE-VS usando diferentes valores de pH de immobilização. Triângulos inteiros: immobilização em fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0. Quadrados completos: immobilização em carbonato de sódio 5 mM a pH 9,0. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.....94

Figura 4.5 Efeito do pH de incubação do biocatalisador PGA em sua estabilidade térmica. A figura mostra os cursos de inativação térmica de PGA immobilizado em pH 7 e incubado em diferentes valores de pH. Triângulos inteiros: pH 7,0. Círculos completos: pH 8,0. Quadrados completos: pH 9,0. Losangos vazios: pH 10,0. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.....96

Figura 4.6 Efeito do tempo de incubação na estabilidade dos biocatalisadores de PGA immobilizados em pH 7 e incubados em pH 10,0 durante diferentes tempos. Triângulos vazios com linha sólida: 1 h. Círculos completos com linha sólida: 3 h. Quadrados completos com linha contínua: 5 h. Quadrados vazios com linha sólida: 24 h. Losango completo com linha sólida: 48 h. Losango vazio com linha contínua: 72 h. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.....98

Figura 4.7 Efeito do agente bloqueador nos cursos de inativação térmica dos biocatalisadores de PGA immobilizados em pH e incubados em pH 10,0 por 5 h. Quadrados completos: glicina. Quadrados vazios: cisteína. Triângulos inteiros: etilenodiamina. Círculos vazios: ácido aspártico. Círculos completos: glicose. Losango completo: etanolamina. Losangos vazios: β -mercaptoetanol. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.....100

Cursos de inativação térmica de PGA solúvel em 50 mM de Tris HCl (quadrados sólidos) e Agarose-MANAE-VS-PGA immobilizado em pH 7, incubado por 5 h em pH 10 e bloqueado com glicina (círculos vazios). Outros detalhes podem ser encontrados na Seção de Materiais.....101

Capítulo 5

Figura 5.1 Atividades dos diferentes biocatalisadores CALA immobilizados (4 mg/g) com 50 mM de triacetina em pH 5,0 em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-CALA; triângulos: Glutaraldeído-CALA e círculos: Octil-VS-

CALA.....115

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALA na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....116

Figura 5.3

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALA na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....117

Figura 5.4

Atividades dos diferentes biocatalisadores de CALB (1 mg/g) imobilizados com 50 mM de triacetina (pH 5,0) em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-CALB; triângulos: Glutaraldeído-CALB e círculos: Octil-VS-CALB.....118

Figura 5.5

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALB na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....119

Figura 5.6

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALB na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....120

Figura 5.7

Atividades dos diferentes biocatalisadores TLL imobilizados (12 mg/g) com triacetina 50 mM (pH 5,0) em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-TLL e triângulos: Octil-VS-TLL.....121

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores TLL na hidrólise de *p*-

NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*- NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*- NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....122

Figura 5.9

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores TLL na hidrólise de *p* - NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*- NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*- NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....123

Figura 5.10

Atividades dos diferentes biocatalisadores CRL immobilizados (4 mg/g) com triacetina 50 mM (pH 5,0) em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-CRL; triângulos: Glutaraldeído-CRL e círculos: Octil-VS-CRL.....124

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CRL na hidrólise de *p* - NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*- NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*- NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....125

Figura 5.12

Figura 5.12

Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CRL na hidrólise de *p* - NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*- NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*- NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF.....126

Capítulo 6

Figura 6.1

Esquema das etapas adotadas no procedimento experimental e caracterização dos produtos da reação.....141

Figura 6.2

Micrografias SEM e mapas XRF (insert). a) octil b) octil-CALA c) octil-VS d) octil-VS-CALA e) octil-aminoglutaraldeído e f) octil-

Figura 6.3 aminoglutaraldeído-CALA.....	144
Figura 6.4 Espectros FTIR. a) Octil (preto) e octil-CALA (azul). b) Octil-VS (preto) e octil-VS-CALA (azul). c) Octil-aminoglutaraldeido (preto) e octil-aminoglutaraldeido-CALA (azul).....	145
Figura 6.5 Espectro ^1H do geraniol obtido no Espectrômetro Brunker na frequência de 500 MHz, destacando-se os principais picos referentes à estrutura do substrato	
Figura 6.6 álcool.....	147
Espectro ^{13}C para geraniol obtido no Espectrômetro Brunker com frequência de 75 MHz, alinhando os picos dos carbonos da estrutura aos seus respectivos deslocamentos químicos.....	148
Espectro de ^1H RMN para butirato de geranila.....	149
Espectro de RMN ^{13}C para butirato de geranila, indicando o pico principal referente à conversão do álcool no éster.....	150

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 3.1	Efeito do pH de imobilização na atividade expressa de PGA imobilizado em VS-agarose. Os biocatalisadores foram imobilizados usando sulfato de sódio 1 M com 50 mM de cada tampão; fosfato de sódio a pH 7,0, fosfato de sódio a pH 8,0 e carbonato de sódio a pH 9,0. A incubação foi realizada em carbonato de sódio 50 mM a pH 9,0 (ácido fenilacético 100 mM e glicerol a 30%) durante 3 h e bloqueio com glicina 2 M a pH 8,0.....	71
Tabela 3.2	Efeito do pH de incubação na atividade expressa de PGA imobilizado em VS-agarose. A enzima foi imobilizada em pH 7,0. A incubação foi realizada em 50 mM de cada tampão (contendo 100 mM de ácido fenilacético e 30% de glicerol); fosfato de sódio a pH 7,0, fosfato de sódio a pH 8,0, carbonato de sódio a pH 9,0 e carbonato de sódio a pH 10,0 durante 3 h. O bloqueio foi realizado por incubação em glicina 2 M a pH 8,0.....	73
Tabela 3.3	Efeito do tempo de incubação na atividade expressa de PGA imobilizado em VS-agarose. A imobilização foi em pH 7 e a incubação foi realizada em carbonato de sódio 50 mM (contendo 100 mM de ácido fenilacético e 30% de glicerol) em pH 10,0. O bloqueio foi realizado por incubação em glicina 2 M a pH 8,0.....	76
Tabela 3.4	Efeito do agente bloqueador na atividade expressa de PGA imobilizado em VS-agarose. A enzima foi imobilizada em sulfato de sódio 1 M/fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, incubada em carbonato de sódio 50 mM (ácido fenilacético 100 mM e glicerol 30%) a pH 10,0 por 3 h. A concentração dos agentes bloqueadores foi de 2 M em pH 8,0 por 48 h.....	77

Capítulo 4

Tabela 4.1	Quantidades de nitrogênio e enxofre presentes nos diferentes suportes à base de grânulos de agarose 4% BCL após sua funcionalização com etilenodiamina (EDA) ou divinil sulfona.....	90
Tabela 4.2	Efeito do pH de imobilização na atividade relativa de diferentes biocatalisadores de PGA nas diferentes etapas do processo de imobilização. Os biocatalisadores foram imobilizados em fosfato de	

sódio 5 mM a pH 7,0 ou carbonato de sódio a pH 9,0. A incubação foi realizada em carbonato de sódio 25 mM a pH 8,0 (100 mM de ácido fenilacético e 30 % de glicerol) por 3 h e o bloqueio foi feito utilizando glicina 2 M a pH
8,0.....94

Tabela 4.3 Efeito do pH de incubação na atividade hidrolítica relativa do PGA. A imobilização foi realizada em fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0. A incubação foi realizada com fosfato de sódio 25 mM em pH 7,0 e 8,0 ou carbonato de sódio em pH 9,0 e 10,0 (sempre foram adicionados 100 mM de ácido fenilacético e glicerol a 30%) por 3 h. O bloqueio foi feito com 2 M de Gly em pH 8,0 por 48 h.....96

Tabela 4.4 Efeito do tempo de incubação na atividade hidrolítica relativa (considerando 100% da atividade da enzima oferecida para a imobilização) dos biocatalisadores PGA imobilizados em fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 e incubados em carbonato de sódio 25 mM (100 mM de ácido fenilacético e 30% de glicerol) a pH 10,0. O bloqueio foi feito com glicina.....98

Tabela 4.5 Efeito do agente bloqueador (2 M) na atividade hidrolítica relativa (considerando 100% da atividade inicial utilizada na imobilização) dos biocatalisadores PGA imobilizados em pH 7 e incubados por 5 h em pH 10,0.....100

Capítulo 5

Tabela 5.1 Atividades dos diferentes biocatalisadores na hidrólise de *p*-NPB 1 mM em pH 7,0 e triacetina 50 mM em pH 5,0 e 25 °C.....113

Capítulo 6

Tabela 6.1 Parâmetros relacionados aos sistemas de composição para as sínteses, submetidas as condições experimentais fixas de 200 rpm, a 50 °C por 360 minutos.....140

Tabela 6.2 Atividades dos diferentes biocatalisadores da lipase de *candida antarctica* A (CALA) na hidrólise de *p*-NPB 1 mM em pH 7,0 à 25 °C.....142

Tabela 6.3 Conversões dos diferentes sistemas reacionais no aroma butirato de geranila.....146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asp	Aminoácido ácido aspártico
CALA	<i>Candida antarctica</i> lipase A
CALB	<i>Candida antarctica</i> lipase B
Cis	Aminoácido cisteina
CRL	<i>Candida rugosa</i>
DVS	Divinilsulfona
EDA	Etilenodiamina
Gli	Aminoácido glicina
Lis	Aminoácido lisina
NIPAB	Ácido 4-etil-3-nitro-benzóico
PGA	Penicilina G Acilase
Ser	Aminoácido serina
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase
Tir	Aminoácido tirosina

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1-INTRODUÇÃO

1. Introdução.....	28
1.1 Objetivos gerais.....	31
1.1.1 <i>Objetivos específicos.</i>	31

CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica.....	34
2.1 Enzimas.....	34
2.2 Lipases.....	36
2.2.1 penicilina G amidase.....	38
2.2.2 Lipase A de <i>Candida antarctica</i>	40
2.3 Imobilização enzimática.....	41
2.3.1 Adsorção física	43
2.3.1.1 Co-precipitação de enzimas.....	45
2.3.2 Ligação covalente.....	45
2.3.3 Reticulação.....	47
2.4 Suportes para imobilização de enzimas.....	48
2.4.1 Polímeros naturais	48
2.4.1.1 Agarose como suporte para imobilização enzimática	48
2.4.1.2 Ativação do suporte para imobilização enzimática.....	50
2.5 Outros suportes utilizados na imobilização enzimática.....	52
2.5.1 Polímeros inorgânicos	52
2.5.2 Imobilizações em nano partículas magnéticas.....	52

CAPÍTULO 3- IMOBILIZAÇÃO DA PENICILINA G ACILASE EM VINILOSULFONA-AGAROSE: UM EFEITO INESPERADO DA FORÇA IÔNICA NO DESEMPENHO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

3.1 Resumo.....	55
3.2 Introdução.....	56
3.3 Materiais e métodos.....	59
3.3.1 Materiais.....	59
3.3.2 Métodos.....	60
3.3.2.1 Ensaio de atividade enzimática	60
3.3.2.2 Determinação da Concentração de Proteína.....	60
3.3.2.3 Preparação de grânulos de agarose VS.....	60
3.3.2.4. Imobilização de PGA em grânulos de agarose de vinilosulfona.....	61
3.3.2.5. Inativação Térmica dos Diferentes Biocatalisadores.....	61
3.4 Resultados.....	62

<i>3.4.1 Imobilização de PGA em grânulos de agarose VS.....</i>	62
<i>3.4.2 Efeito da força do íon na imobilização de PGA em grânulos de agarose de vinilsulfona.....</i>	65
<i>3.4.3. Efeito de diferentes condições experimentais das diferentes etapas da preparação do biocatalisador PGA-VS-Agarose em suas características finais.....</i>	70
<i> 3.4.3.1. Efeito do pH de imobilização.....</i>	70
<i> 3.4.3.2. Efeito das Condições de Incubação.....</i>	72
<i> 3.4.3.3. Efeito da Etapa de Bloqueio.....</i>	77
3.5 Conclusões.....	79

CAPÍTULO 4- SINERGIA DE TROCA IÔNICA E REAÇÃO COVALENTE: IMOBILIZAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE EM AMINO-VINILSULFONA AGAROSE HETEROFUNCIONAL

4.1 Resumo.....	81
4.2 Introdução.....	82
4.3	Materiais
Métodos.....	85
<i> 4.3.1 Materiais.....</i>	85
<i> 4.3.2 Métodos.....</i>	85
<i> 4.3.2.1. Determinação da atividade hidrolítica da PGA.....</i>	85
<i> 4.3.2.2. Preparação de Esferas de Agarose-MANAE-VS</i>	86
<i> 4.3.2.3. Imobilização de PGA em Esferas de Agarose-MANAE-VS.....</i>	86
<i> 4.3.2.4 Inativação Térmica de Diferentes Biocatalisadores.....</i>	87
4.4. Resultados	87
<i> 4.4.1. Imobilização de PGA em Agarose-VS e em Agarose-MANAE</i>	87
<i> 4.4.2 Preparação de Esferas de Agarose-MANAE-VS.....</i>	89
<i> 4.4.3 Imobilização de PGA em grânulos de Agarose-MANAE-VS</i>	91
<i> 4.4.4. Estudo dos Parâmetros Definidores dos Parâmetros Funcionais da Agarose-MANAE-VS-</i>	
<i> PGA.....</i>	92
<i> 4.4.4.1. Efeito do pH de imobilização.....</i>	92
<i> 4.4.4.2. Efeito do pH de incubação.....</i>	95
<i> 4.4.4.3. Efeito do tempo de incubação.....</i>	97
<i> 4.4.4.4 Efeito do Agente de Bloqueio</i>	99
4.5 Conclusões	102

CAPÍTULO 5- A DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA DEPENDE DO SUBSTRATO E DA CONDIÇÃO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE: INATIVAÇÕES DE ESTRESSE E TEMPERATURA ÓTIMA COMO INDICADORES DE ESTABILIDADE DE BIOCATALISADORES

5.1				
Resumo.....	104			
5.2 Introdução	105			
5.3 Materiais e métodos	108			
5.3.1 Materiais	108			
5.3.2 Métodos	109			
5.3.2.1Preparação de grânulos de octil-Dinilsulfonaagarose.....	109			
5.3.2.2Preparação do suporte de glutaraldeído-agarose.....	109			
5.3.2.3 Imobilização de enzimas.....	109			
5.3.2.3.1 Imobilização de lipases em grânulos de octil agarose.....	110			
5.3.2.3.2 Imobilização de lipases em grânulos de octil-vinil sulfona agarose.....	110			
5.3.2.3.3 Imobilização de lipases em grânulos de amino-glutaraldeído-agarose.....	110			
5.3.2.4 Determinação da atividade enzimática usando diferentes substratos.....	111			
5.3.2.4.1Hidrólise de p- NPB.....	111			
5.3.2.4.2 Hidrólise de triacetina.....	111			
5.3.2.5 Inativações térmicas e atividade recuperada	112			
5.4 Resultados	112			
5.4.1 Imobilização das diferentes enzimas	112			
5.4.2 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade das diferentes preparações de CALA	114			
5.4.3 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade das diferentes preparações de CALB	118			
5.4.4 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade das diferentes preparações de TLL	121			
5.4.5 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade de diferentes preparações de CRL	123			
5.5 Discussão	126			
5.6 Conclusão	129			

CAPÍTULO 6- MODULAÇÃO DAS PROPRIEDADES DA LIPASE USANDO DIFERENTES FUNCIONALIZAÇÕES DO SUPORTE: APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES AROMÁTICOS

6.1				
Resumo.....	131			
6.2 Introdução.....	132			
6.3 Material e Métodos.....	136			
6.3.1 Material.....	136			
6.3.2 Métodos.....	137			
6.3.2.1 Determinação da atividade hidrolítica da Cala.....	137			
6.3.2.2 Preparação de grânulos de octil-vinilsulfona agarose.....	137			
6.3.2.3 Preparação do suporte de aminoglutaraldeído agarose.....	137			
6.3.2.4 Imobilização da lipase Cala em grânulos de octil agarose.....	138			
6.3.2.5 Imobilização da lipase Cala em grânulos de octil-vinilsulfona				

<i>agarose</i>	138
6.3.2.6 <i>Imobilização da lipase Cala em grânulo de aminoglutaraldeído agarose</i>	138
6.3.2.7 <i>Parâmetros de imobilização</i>	139
6.3.2.8 <i>Caracterização estrutural dos suportes e dos biocatalisadores</i>	139
6.3.2.8.1 Análise por Fluorescência de Raio-X (FRX).....	139
6.3.2.8.2 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR).....	139
6.3.2.9 <i>Síntese do aroma butirato de geranila</i>	140
6.3.2.9.1 Estimativa do grau de síntese.....	141
6.3.2.9.2 Caracterização dos produtos da reação.....	141
6.4 Resultados e Discussão	142
6.4.1 <i>Determinação dos parâmetros de imobilização</i>	142
6.4.2 <i>Análise por Fluorescência de Raio-X (FRX)</i>	143
6.4.3 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR)	144
6.4.4 Esterificação dos biocatalisadores de Cala.....	146
6.4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio (^1H RMN) e do Carbono (^{13}C RMN).....	
6.4.4.1.1 RMN do substrato.....	147
6.4.4.1.2 RMN do produto da reação.....	148
6.5 Conclusões	150
CONCLUSÃO	151
REFERÊNCIAS	152

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As enzimas atuam como catalisadores biológicos, apresentando biocompatibilidade e biodegradabilidade, atuando na energia de ativação da reação, acelerando o funcionamento dessa (CASTAÑEDA-VALBUENA et al., 2022). Apresentam um excelente potencial em diversos setores da indústria moderna graças à sua alta atividade em condições amenas, especificidade e seletividade, tornando seu uso vantajoso em comparação com catalisadores químicos convencionais (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; SHELDON; VAN PELT, 2013). Sua atuação aplica-se desde o ramo alimentício (TAVANO et al., 2018), produção de energia (biocombustíveis) (AGARWAL, 2007; LUQUE; CLARK, 2011; ODA et al., 2005) bem como no desenvolvimento de fármacos (MUPPALANENI, 2013).

Dentre as enzimas utilizadas em meios industriais destacam-se as lipases, por apresentarem alta estabilidade, atividade e especificidade, sendo utilizadas numa diversa gama de condições de reação. (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; LEE et al., 2008; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020). São enzimas que trabalham sob um mecanismo denominado ativação interfacial (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; SCHMID; VERGER, 1998; VERGER, 1997b), desempenhando sua função natural de realizar a catálise na interface de gotas de substratos insolúveis (óleos ou gorduras). As lipases apresentam na sua composição estrutural uma cadeia polipeptídica denominada tampa ou ABA, que limita o centro ativo do meio reacional. De acordo com sua mobilidade, a tampa se abre quando em contato com uma superfície hidrofóbica, expondo assim o sítio ativo, iniciando o processo catalítico sobre a superfície do substrato, aumentando a atividade da lipase. (BRZOZOWSKI et al., 1991a; DEREWENDA et al., 1992; VAN TILBEURGH et al., 1993).

Embora sejam catalisadores eficientes em condições fisiológicas, haja vista sua função natural, muitas características enzimáticas não conseguem suprir as exigências impostas por um meio industrial, se tornando relativamente instáveis em meios reacionais sendo sujeitas, por exemplo, a alta solubilidade em meio aquoso bem como inibição por diferentes compostos. (SCHOEMAKER, 2003). Nesse contexto, a melhoria das propriedades enzimáticas pode ser conseguida por diferentes estratégias, tais como a manipulação genética, a modificação química, imobilização enzimática, ou pela combinação destas (MATEO, et al. 2007; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; BARBOSA, et al. 2014; GODOY, DE LAS RIVAS,

GUISÁN, et al. 2014). A fim de solucionar problemáticas citadas anteriormente, como também a reutilização e recuperação enzimática, um processo de imobilização, como já mencionado, faz-se necessário na implementação de um bioprocesso, além de proporcionar o aumento da utilização dessas em escala industrial (KARAMI et al., 2020; YAO et al., 2022). Um protocolo de imobilização eficaz proporciona uma maior estabilidade, seletividade e especificidade enzimática (BIJOY et al., 2022; VELJKOVIĆ et al., 2023), ampliando o uso de enzimas em um maior leque de aplicações KAZLAUSKAS, 2016; MOSBACH, 1980; TAHERI-KAFRANI et al., 2021), haja vista a redução de processos de inibição enzimática (GARCIA-GALAN et al., 2011; LOZANO; BERNAL; VAULTIER, 2011; MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013), convertendo este requisito em uma ferramenta benéfica no desempenho de enzimas. Outra característica que será beneficiada pelo protocolo de imobilização é a atividade da enzima que, em geral, sofre influencia da temperatura. A atividade enzimática tende a um aumento do seu efeito quando a temperatura do meio reacional é elevada. Contudo, quando ocorre aproximação da temperatura ideal, onde a atividade máxima é constatada, esse aumento tende a um declínio que será cada vez mais significativo ao ultrapassar a temperatura ideal (DILL; GHOSH; SCHMIT, 2011). O protocolo de imobilização enzimático deve ser realizado adequadamente a fim de permitir o devido controle das interações entre a enzima-suporte, evitando uma menor estabilidade da enzima imobilizada em relação à enzima livre. O mecanismo de imobilização e a estabilidade são características que se relacionam, pois aqueles biocatalisadores que apresentem uma maior estabilidade enzimática, possivelmente serão empregados em outras reutilizações (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; RODRIGUES et al., 2019, 2021; SIAR et al., 2017a).

A imobilização da enzima pode ser realizada via utilização de suportes insolúveis em água, onde a enzima estará contida nessa estrutura (BRYJAK; LIESIENE; KOLARZ, 2008; CHEN et al., 2016; HILTERHAUS; THUM; LIESE, 2008; VAGHARI et al., 2016). Para isso, a enzima poderá interagir por diferentes estratégias, como vias de interações físicas ou por ligações covalentes, utilizando para isso um suporte sólido pré-existente, havendo assim a fixação enzimática (MATEO et al., 2000b; RODRIGUES et al., 2009d; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2016) . Em geral, os processos de adsorção, ligação covalente, encapsulamento e reticulação são os métodos mais comuns a serem usados na imobilização de enzimas. A adsorção é uma técnica de baixo custo e simples sendo mantida via interação multiponto enzima-suporte, no qual o suporte permanecerá fisicamente ativo, por meio de forças fracas,

como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (BERNAL; ILLANES; WILSON, 2014; DU et al., 2019; MARTY; DOSSAT; CONDORET, 1997; MATEO et al., 2006; REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017a; ZHANG et al., 2017). Ainda que a adsorção física seja tradicionalmente considerada um procedimento mais simples quando comparada à ligação covalente, é provável que ocorram interações indesejáveis enzima-suporte, proporcionando a incorreta estabilização das estruturas enzimáticas.(BOMMARIUS; PAYE, 2013; IYER; ANANTHANARAYAN, 2008)

As interações que ocorrem via ligação covalente são baseadas nas fortes ligações ocorrentes entre a enzima e o suporte, onde esse pode ser totalmente inerte após a imobilização da enzima (ANTUNES LOPES et al., 2020; BONAZZA et al., 2018; MANZO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2009a; RUEDA et al., 2015a). Nesse tipo de interação pode ocorrer a ligação de apenas um ponto entre a enzima e o suporte, mantendo inalterada as características da enzimática bem como a ligação covalente multipontual, que em contrapartida é um método mais eficiente que visa melhorar a estabilidade enzimática quando o processo ocorre sob um adequado controle (BRAHAM et al., 2021c; GRAZÚ et al., 2010a, 2010b; MATEO et al., 2002a, 2002b; MORELLON-STERLING et al., 2021a).

Um dos protocolos que visa imobilizar enzimas via ligação covalente multipontual é através do uso de suportes ativados por grupos vinilsulfona (VS) (DA ROCHA et al., 2022b; DOS SANTOS et al., 2015d; IZQUIERDO et al., 2014; MANTIONE et al., 2017; MORELLON-STERLING; BOLIVAR; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022). A imobilização de enzimas em suportes ativados por VS inclui três etapas importantes, a fim de promover a formação de um biocatalisador estável. A imobilização da enzima é a primeira etapa desse processo, no qual irá determinar a área que estará envolvida nas reações enzima- suporte. A segunda etapa está relacionada ao processo de incubação da enzima já previamente imobilizada, que irá determinar a intensidade da ligação covalente entre os grupos enzima-suporte. Por fim a última etapa, onde irá ocorrer o bloqueio dos grupos vinilsulfona (VS) remanescentes a fim de evitar interações indesejáveis enzima-suporte durante a reação (DOS SANTOS et al., 2015c, 2015e; SANTOS et al., 2015b). É de fundamental importância a otimização do protocolo de imobilização através da realização das três etapas constituintes ao uso de suportes ativados com vinilsulfona, a fim de evitar danos relacionados à estabilidade da enzima, como também a especificidade e atividade enzimática do biocatalisador a ser formado.

Nessa pesquisa, apresenta-se um estudo acerca do desenvolvimento de estratégias de imobilização que visem a otimização das propriedades de enzimas através de interações físico-químicas, tendo em vista a produção de biocatalisadores enzimáticos estáveis. Os protocolos abordados foram desenvolvidos através do uso de diferentes suportes na imobilização de enzimas à fim de proporcionar melhorias na eficiência catalítica bem como a estabilidade das enzimas em questão.

Para uma melhor explanação desse estudo, os resultados estarão dispostos em formato de capítulos. Os capítulos 3 e 4 relatam, respectivamente, estudos de biocatalisadores preparados através da imobilização da enzima penicilina G acilase em suporte agarose ativada com divinilsulfona e em agarose modificada com grupamentos amino e ativado com divinilsulfona. Foram realizados para esse fim, análises de estabilidade enzimática bem como medidas de atividade ao longo do processo de imobilização da enzima. No capítulo 5 será discutido o estudo da termoestabilidade de diferentes lipases imobilizadas em suportes de natureza distintas. O comportamento dos diferentes biocatalisadores foram analisados através de inativações térmicas em temperaturas distintas utilizando os reagentes triacetina e *p*-nitrofenilbutirato como substratos, apresentando especificidades que diferem ao ser proporcionado distintas condições reacionais. Por fim, para o capítulo 6 será avaliada a modulação das propriedades da lipase A de *Candida antarctica* mediante diferentes funcionalizações de suporte e posterior aplicação na síntese de ésteres aromáticos.

1.1 Objetivos Gerais

Este estudo tem por objetivo principal o desenvolvimento e a otimização dos biocatalisadores produzidos, a partir das diferentes estratégias de imobilização e modificação química dos suportes, mediante análise das estabilidades e atividades enzimáticas.

1.1.1 *Objetivos específicos*

1. Preparar e caracterizar suporte de agarose ativada com divinilsulfona tendo em vista um protocolo de imobilização enzimática por ligação covalente multipontual;
2. Realizar a imobilização da enzima penicilina G acilase de *Escherichia coli* em agarose ativada com divinilsulfona mediante o estudo da atividade e estabilidade do biocatalisador;

3. Avaliação da atividade catalítica através de condições de estresse térmico dos biocatalisadores produzidos através da agarose ativada com divinilsulfona;
4. Averiguar a versatilidade do suporte heterofuncional preparado a partir de grânulos de agarose modificados com grupos aminovinilsulfona na imobilização da enzima penicilina G acilase (PGA);
5. Otimizar as propriedades catalíticas da PGA imobilizada em suporte ativado com divinilsulfona através da alteração das etapas de imobilização;
6. Analisar as estabilidades dos diferentes biocatalisadores de lipases imobilizadas sob diferentes condições de estresse, através da interação com dois substratos distintos;
7. Promover a síntese do aroma butirato de geranila através da aplicação dos biocatalisadores de *Candida antarctica* A (CALA), produzidos a partir de diferentes ativações do suporte.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos, diminuindo a energia de ativação entre o reagente e produto acelerando, dessa forma, a interação entre ligações químicas, apresentando uma alta eficiência catalítica que permite o uso dessas em processos industriais (CASTAÑEDA-VALBUENA et al., 2022). Elas são biocompatíveis, biodegradáveis e derivadas a partir de recursos renováveis, como micro-organismos, fungos e plantas. Devido às suas excelentes propriedades funcionais, as enzimas são capazes de catalisar os processos químicos mais complexos, nas condições experimentais e ambientais mais benignas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; SHELDON; VAN PELT, 2013), sendo amplamente utilizadas nas indústrias de alimento, cosmética e de combustível (SAMPAIO et al., 2022), tornando seu uso vantajoso em comparação com catalisadores químicos convencionais.

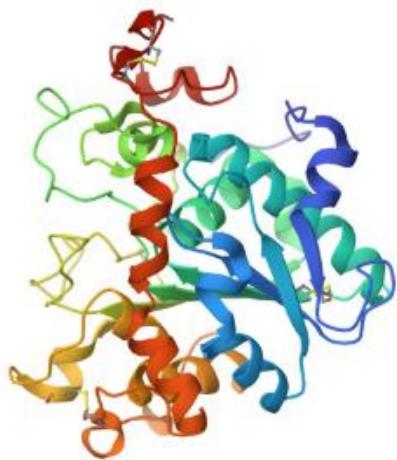
Apresentam um elevado nível de eficiência catalítica, superando os catalisadores químicos, apresentando um elevado grau de especificidade que permite a distinção não apenas entre as reações, como também partes similares entre moléculas (regioespecificidade), substratos (especificidade de substrato), e entre isômeros ópticos (estereoespecificidade), (KRAJEWSKA, 2004). Além disso, as enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão atingindo velocidades da ordem de reação conseguida com catalisadores químicos, em condições extremas de reações (KRAJEWSKA, 2004); (SHELDON; VAN PELT, 2013). Os benefícios oriundos as características relacionadas às enzimas proporcionam a diminuição no consumo de energia e redução de subprodutos indesejáveis, consequência de sua elevada especificidade que proporciona um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e diminuição da quantidade de resíduos (GUISAN, 2013) (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A nomenclatura enzimática é classificada pelo comitê *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB), onde as mesmas são catalogadas em seis grandes grupos (Classes), de acordo com o tipo de reação que catalisam. Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “E.C.”

(*Enzyme Commission of the NC-IUBMB*), que é composto por 4 dígitos (CORNISH-BOWDEN, 2014).

Com relação as classes dispostas pelas enzimas, as oxirreduases catalisam reações do tipo redox, ou seja, as reações que envolvem a transferência de elétrons de uma molécula para outra. Em sistemas biológicos, muitas vezes, ocorre a remoção de átomos de hidrogênio por enzimas, a partir de um substrato, sendo assim denominadas de desidrogenases. A enzima lacase tem por característica esse mecanismo de ação, oxidando uma variedade de compostos com grupamentos aromáticos e fenólicos, havendo também a redução do oxigênio à água (ADDORISIO et al., 2013). Transferase é a classe na qual as enzimas catalisam a transferência dos grupos de átomos de uma molécula para outra, sendo as mais comuns as aciltransferases e as glicosiltransferases (ALCALDE et al., 2001). As liases são enzimas que catalisam a adição de grupos a ligações duplas, ou a criação de ligações duplas pela retirada de grupos. Assim, as ligações são clivadas por um mecanismo diferente a partir de hidrólise. Lases de pectato, por exemplo, divide as ligações glicosídicas na pectina em uma reação de eliminação deixando um resíduo ácido glucurônico com uma ligação dupla (SHARMA et al., 2022). Enzimas pertencentes a classe das isomerases catalisam rearranjos dos átomos dentro da mesma molécula; por exemplo, a glicose - fosfato isômerase que converte glicose em frutose (GUO et al., 2019). A penúltima classe enzimática destaca-se as ligases, que tem por finalidade a união de moléculas com ligações covalentes em reações biossintéticas. Tais reações requerem o fornecimento de energia a partir da hidrólise de uma ligação concorrente difosfato de ATP, o que faz com que este tipo de enzima seja de difícil aplicação comercialmente (HEMU et al., 2020). Por fim, as enzimas referentes a classe das hidrolases catalisam a hidrólise, ou seja, a clivagem de substratos em meio contendo água. As reações incluem a clivagem das ligações peptídicas em proteínas por proteases, ligações glicosídicas em hidratos de carbono de uma grande variedade de hidratos de carbono, e de ligações éster nos lipídeos por lipases. As lipases, representada na Figura 2.1, estão entre as enzimas mais utilizadas na tecnologia enzimática por reconhecerem uma grande variedade de substratos e poder catalisar muitas reações diferentes, tais como a hidrólise ou a síntese de ésteres de ligações, alcoólise, aminólise peroxidações, epoxidações e interesterificações (OLIVEIRA et al., 2010).

Figura 2.1 Estrutura da enzima lipase B de *Candida antarctica*, código Protein Data Bank (PDB): 4K5Q



Fonte: (XIE et al., 2014)

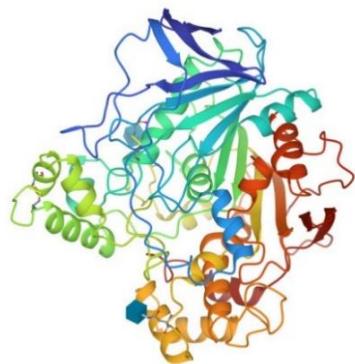
2.2 Lipases

As lipases estão entre as enzimas mais utilizadas no ramo da tecnologia enzimática, porque reconhecem uma grande variedade de substratos e podem catalisar muitas reações diferentes, tais como, hidrólise (Figura 2.2), aminólise, peroxidações, epoxidações e interesterificações (BEZERRA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018; FERNANDES et al., 2021; LIMA et al., 2017; MELO et al., 2017; RIOS et al., 2019a).

Sendo parte da classe das hidrolases, as lipases (EC 3.1.1.3) são capazes de catalisar uma variedade de reações químicas presentes na interface água-lipídio, e assim como reações mencionadas anteriormente, catalisam reações de esterificação, transesterificação, alcoólise, reações essas que demandam baixo teor de água, e com isso amplamente utilizadas na indústria (SUN; LI, 2020) (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Atualmente essas enzimas são usadas como biocatalisadores importantes na formação de produtos de interesse industrial, em diversas aplicações biotecnológicas atuais, como por exemplo na indústria farmacêutica, produção de energia (biocombustíveis) e produção de polímeros (BONAZZA et al., 2018; KHODADADI YAZDI et al., 2020). São enzimas capazes de converter totalmente o substrato, a depender da aplicação desejada. Uma lipase mesmo apresentando uma baixa especificidade, quando utilizada na produção de biodiesel, os triglicerídeos podem ser totalmente convertidos em ésteres de ácidos graxos (AGARWAL, 2007; ODA et al., 2005; SANTIAGO et al., 2018).

Com isso, as lipases apresentam uma ampla gama de aplicações importantes, que vão desde a modificação de óleos e gorduras e formulação de detergentes, até as sínteses de fragrâncias, aromas e produção de biodiesel (COSTA-SILVA et al., 2021; GHAZALI; HAMIDAH; CHE MAN, 1995; LOUHASAKUL et al., 2019; ODA et al., 2005).

Figura 2.2 Estrutura tridimensional da lipase de *Candida rugosa*



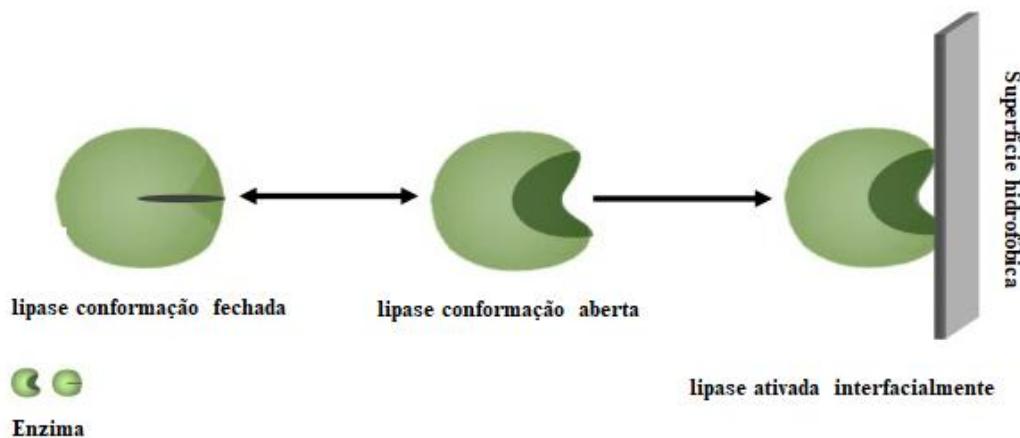
Fonte: (GROCHULSKI et al., 1994)

As lipases podem ser encontradas no organismo humano, como é o caso da lipase secretada pelo pâncreas, degradando as lipoproteínas e reduzindo dessa forma, os efeitos relacionados à obesidade (TACIAS-PASCACIO et al., 2021). As lipases microbianas são produzidas por microrganismos, com mais de 200 tipos dessas, sendo assim as mais utilizadas em processos industriais (SALGADO; DOS SANTOS; VANETTI, 2022). Essas enzimas podem ser utilizadas de forma extra ou intracelular, em líquidos, de forma immobilizada ou livre (RUEDA et al., 2016b), com diferentes especificidades de substrato, seletividade e propriedades bioquímicas (C. WANCURA et al., 2020). Com essas diversas formas, as lipases apresentam inúmeras vantagens, como estabilidade e alta versatilidade. As lipases que são utilizadas em aplicações industriais geralmente são de origem microbiana ou fúngica, como *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas fluorescens* e a *Thermomyces lanuginosus* (C. WANCURA et al., 2020; CYGLER; SCHRAG, 1999; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; LUAN; ZHOU, 2017).

São enzimas bastante robustas que apresentam uma alta atividade, baixa especificidade, fazendo com que elas reconheçam diversos substratos, podendo apresentar uma alta seletividade e regio/enantioseletividade em alguns casos (ABREU SILVEIRA et al., 2019). São bastante conhecidas por serem enzimas interfaciais (FERREIRA et al., 2018),

possuindo uma cadeia polipeptídica móvel denominada de Tampa ou ABA que, dependendo do equilíbrio em meio homogêneo, podem existir de forma aberta ou fechada (FAN et al., 2018). A forma fechada da enzima faz com que o centro ativo da enzima seja bloqueado pela tampa. Na forma aberta, o centro ativo entra em contato com o solvente, expondo uma grande bolsa hidrofóbica ao meio (RUEDA et al., 2016a). O processo de ativação interfacial ocorre quando o equilíbrio conformacional é deslocado provocando um aumento na atividade enzimática. Isso ocorre quando o substrato de natureza hidrofóbica (gota de óleo) é fortemente adsorvido pela lipase, onde essa ataca fortemente esse meio (COSTA-SILVA et al., 2021) e depois poderá se fechar, tornando-se inativa e estável (MANCHEÑO et al., 2003), como visto na Figura 2.3.

Figura 2.3 Equilíbrio conformacional das lipases.



Fonte: (MONTEIRO et al., 2021)

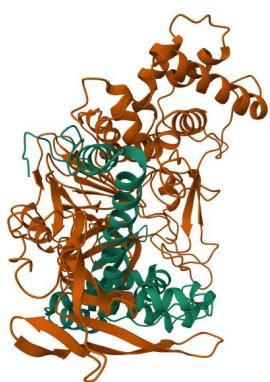
Esse mecanismo de ativação interfacial torna a estrutura das lipases bastante flexível (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017b) e com isso pode sofrer adequações, como é o caso das modificações via genética, química ou através de diversos protocolos de imobilização (FERREIRA et al., 2018).

2.2.1 penicilina G amidase

A *penicilina G amidase* (E.C 3.5.1.11), também denominada de *penicilina G acilase*, *penicilina amidohidrolase* e *penicilina aciltransferase*, é produzida por alguns microrganismos, contudo mais usualmente produzida pela bactéria *Escherichia coli*, é

representada por uma estrutura dimérica (α , β), como representado na Figura 2.4. A subunidade α (209 AA e 20500Da) tem por função o reconhecimento da cadeia lateral do substrato e a subunidade β , composta de 557 AA e 69000Da, pela ação catalítica (SCHUMACHER et al., 1986). Apresenta subpopulações de aminoácidos onde ocorre variação do ponto isoelétrico entre 6,7 e 6,9. Sua estrutura é baseada em um sítio ativo rodeado por resíduos de ambas as unidades (α e β), apresentando a serina $\beta1$, asparagina e alanina como resíduos inseridos dentro centro catalítico, classificada assim como uma hidrolase N-terminal (DONE et al., 1998b).

Figura 2.4 Estrutura tridimensional da penicilina G acilase de *Escherichia coli*



Fonte: (DONE et al., 1998a)

A penicilina G acilase é utilizada em vários processos biotecnológicos, como catalisador para hidrólise enantiosseletiva de álcoois e ácidos quirais (BALDARO et al., 1993; FUGANTI et al., 1988, 1992) bem como grupos aminos (ROSSI; CALCAGNI; ROMEO, 1979). Tem como aplicação industrial mais relevante a hidrólise da penicilina G, liberando a partir desse mecanismo o ácido fenilacético e o ácido -amino-penicilânico (6-APA). Estes ácidos, por meio de uma acilação química, são responsáveis pela produção de antibióticos, como a cefalexina, ampicilina e amoxilina (GABOR; DE VRIES; JANSSEN, 2005; ZMIJEWSKI et al., 1991).

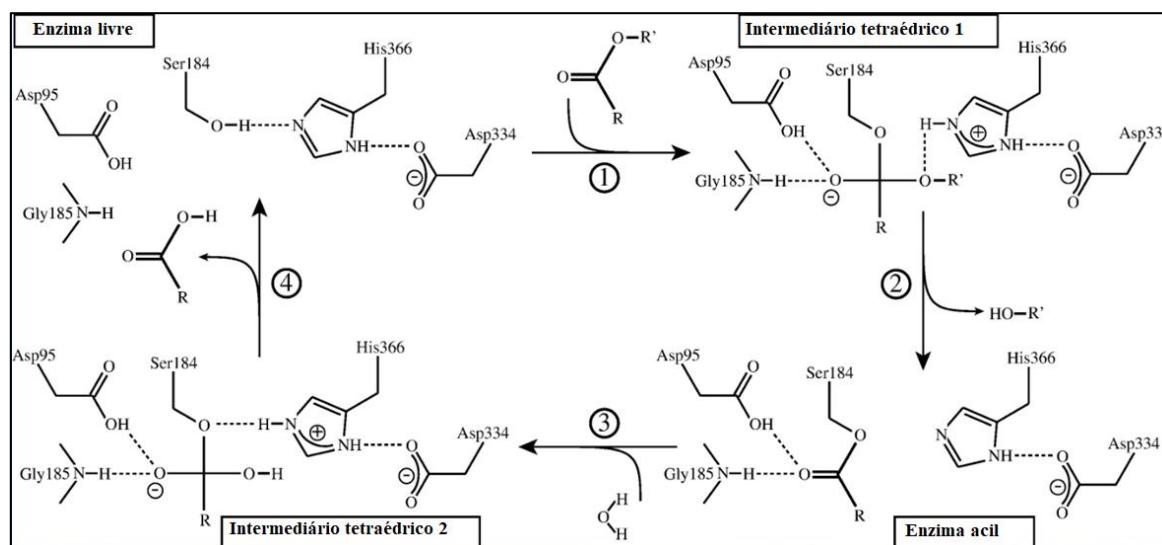
Segundo estudo realizado por (MORELLON-STERLING et al., 2021a), a penicilina G acilase foi imobilizada em um suporte de glioxilagarose (através da adição de diferentes grupos amina) a fim de averiguar a estabilidade dessa composição. A fim de comparar os dados obtidos com a PGA, foi realizado também o estudo dos biocatalisadores formados por tripsina, quimiotripsina e ficina, utilizando o mesmo suporte, via ligação covalente

multipontual. Os investigadores observaram que a estabilidade da PGA immobilizada em suporte aminado com octilamina, apresentou um efeito bastante significativo, sendo constatado que a glioxil agarose imersa em pH alcalino, foi capaz de immobilizar as enzimas de forma extremamente rápida.

2.2.2 Lipase A de *Candida antarctica*

A lipase A de *Candida antarctica* (E.C 3.1.1.3) é considerada uma das lipases mais termoestáveis, apresentando eficiência catalítica em temperaturas superiores a 90 °C (HELDT-HANSEN et al., 1989). Possui 431 aminoácidos na sua constituição, ponto isoelétrico (pI) igual a 7,5 e peso molecular de 45 kDa. A CALA é a única lipase capaz de catalisar a resolução cinética de álcoois terciários estericamente impedidos volumosos (HELDT-HANSEN et al., 1989; TANYELİ; ÖZDEMIRHAN, 2014), contudo, seu uso em processos de biotransformação em síntese orgânica não seja tão habitual quanto a forma B de *Candida antarctica*. (LIMA et al., 2019). É uma enzima que realiza a catálise da transferência de grupos acila de álcoois ou aminas (MÜLLER et al., 2014, 2015), como pode ser visto na Figura 2.5, e na presença de substratos de ésteres de ácidos graxos, é observado uma maior preferência por ácidos de cadeia longa (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005b; KIRK; CHRISTENSEN, 2002) e para os triglicerídeos uma preferência por substituições nucleofílicas de segunda ordem (sn 2) (ROGALSKA et al., 1993).

Figura 2.5 Mecanismo de reação da lipase A de *Candida antarctica*



Fonte: (ERICSSON et al., 2008)

A CALA apresenta uma estrutura com uma tampa bem definida, sendo a tríade catalítica composta por Ser184, Asp334 e His366, no qual a sequência dessas é bastante característica das lipases, assim como o domínio α/β hidrolase (RAUWERDINK; KAZLAUSKAS, 2015). A CALA foi imobilizada diversos suportes, sendo dentre esses, os suportes hidrofóbicos apresentados como uma alternativa geralmente simples com obtenção de bons resultados. Um grupo de estudo (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019) analisou a lipase A de *Candida antarctica* (comercializada como Novocor ADL) através da imobilização em suporte octil-agarose revestido com polietilenonimina, a fim de melhorar a estabilidade da constituição. O desempenho desse biocatalisador foi comparado a constituição referente a lipase B de *Candida antarctica* onde concluíram que o octil-CALA apresentou maiores atividades na hidrólise do substrato *p*-NPB. A vantagem em relação a forma B dependeu de reações específicas assim como das condições reacionais ao qual estava inserido.

2.3 Imobilização enzimática

O processo de imobilização enzimática é realizado através do aprisionamento da enzima em uma região específica de uma matriz polimérica ou suporte de natureza diversa (gel ou membrana) (HOU et al., 2019), sendo essa fixação por ocorrida através de interação física ou por meio de ligação química (DE ANDRADES et al., 2019). A imobilização é uma tecnologia necessária a fim de produzir um biocatalisador estável e com atividade. Por isso, dependendo das condições de imobilização e estabilidade, a enzima poderá ser posteriormente reutilizada (DAL MAGRO et al., 2019). Contudo, para obtenção de um biocatalisador estável, é necessário que o mecanismo de imobilização seja simples, ou seja, sem requerer o preparo do suporte mediante um custo elevado ou de uma elevada pureza enzimática (SHELDON; VAN PELT, 2013). Um protocolo de imobilização eficiente pode ser um instrumento extremamente útil e de elevado potencial, que visa melhorar o custo no desempenho da enzima. Contudo, deve ser levado em conta que as estratégias não podem ser competidoras e que elas sejam compatíveis para obtenção da estabilidade operacional do biocatalisador (BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018). A imobilização enzimática promove um processo de separação da lipase com o produto de forma simples, tornando o meio insolúvel, fixando de forma eficiente a enzima ao suporte (MONTEIRO et al., 2021).

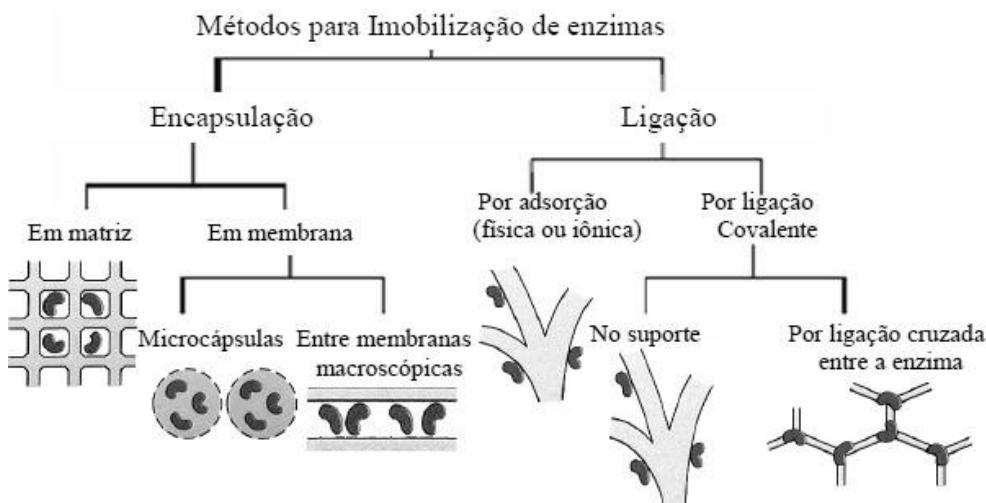
O protocolo de imobilização é realizado a partir da avaliação de alguns parâmetros,

como a desativação e regeneração da enzima, custo do método de imobilização, toxicidade dos reagentes, atividade enzimática global, o efeito da utilização da lipase, bem como as propriedades finais desejadas da enzima imobilizada a ser agregada ao suporte (GUISAN, 2013). A imobilização além de aumentar a estabilidade da enzima promove também resultados significativos nas propriedades enzimáticas devido à rigidificação da proteína, alteração do ambiente enzimático, bloqueio de alguns grupos ou através da distorção estrutural que ele pode produzir (RODRIGUES et al., 2013).

Todos os benefícios citados anteriormente, relacionados às características enzimáticas, dependem da compreensão e do controle dos protocolos de imobilização utilizados, podendo levar a um mal funcionamento da enzima caso não sejam realizados corretamente (CARBALLARES et al., 2021). Com relação ao suporte utilizado, caso apresente uma superfície fisicamente não inerte ou, se mantiver grupos reativos após a imobilização, pode ocasionar algumas alterações conformacionais indesejáveis à enzima durante a operação, reduzindo a estabilidade operacional do biocatalisador (SANTOS et al., 2015a) . Assim, um protocolo de imobilização adequado vai depender das características específicas relacionadas a enzima, o suporte a ser utilizado, as características do meio reacional, das propriedades do substrato e do produto formado (BOLIVAR; EISL; NIDETZKY, 2016; SHELDON; BASSO; BRADY, 2021).

O conhecimento de diversas técnicas de imobilização é conveniente para proporcionar a modulação das características necessárias para o preparo de biocatalisadores específicos para cada processo (FERREIRA et al., 2018). A Figura 2.6 relaciona os protocolos de imobilização enzimática utilizados no preparo de um biocatalisador. Dentre eles é destacado o uso da adsorção (física ou por troca iônica) ou da ligação covalente, que pode se basear na presença de um suporte ou através da ligação cruzada entre as enzimas. Um mecanismo de imobilização também pode se basear no confinamento de enzimas em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento em membrana polimérica em micelas reversas. Outra possibilidade de protocolo é através da imobilização de enzimas em matrizes sólidas, embora sejam também utilizados alguns polímeros que podem ser solúveis ou insolúveis dependendo das condições de reação como o pH, temperatura ou a adição de espécies químicas (VILLENEUVE et al., 2000).

Figura 2.6 Protocolos de imobilização enzimática



Fonte: (DALLA-VECCHIA et al., 2004)

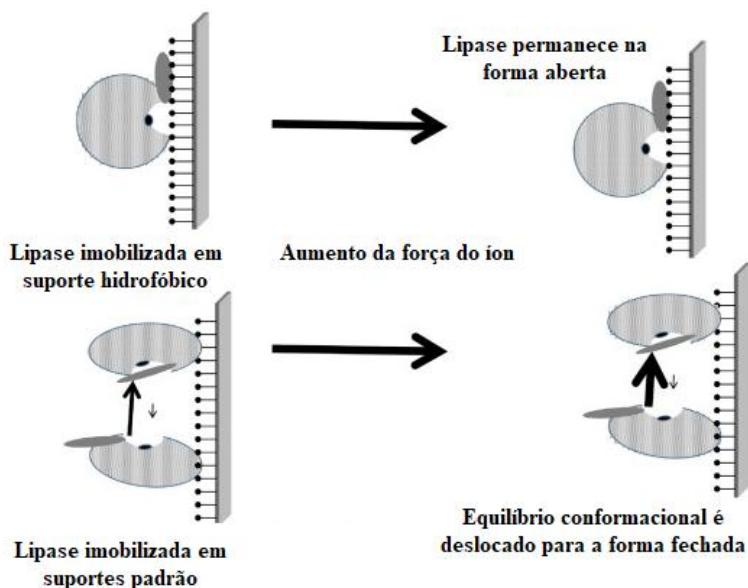
2.3.1 Adsorção física

A imobilização por adsorção ocorre quando a enzima é imobilizada ao suporte por interações fracas, como forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. É uma técnica que requer condições suaves e, embora seja uma interação mais fraca comparada a interação covalente, ela necessita que haja uma imobilização multipontual entre a enzima e o suporte. Esse mecanismo torna-se permanentemente ativo, ocasionando novas interações e com isso a baixa estabilidade entre eles (BINAIEIAN; BABAEE ZADVARZI; YUAN, 2020). Para que a estrutura enzimática permaneça inalterada, a carga não poderá ultrapassar a carga oposta ao suporte, a fim de evitar repulsões eletrostáticas (HENRIQUE DA SILVA CAVALCANTI et al., 2022).

A utilização de suportes hidrofóbicos na imobilização de lipases está diretamente relacionada a sua função natural, a ativação interfacial (descrita em seção anterior). Nesse mecanismo, há o envolvimento das moléculas de lipase que estão na forma monomérica e aberta, resultando na adsorção da enzima no suporte. Com isso, não se faz necessário a utilização de interfaces externas (MANOEL et al., 2015) e que tanto a estrutura quanto os grupos do suporte, poderão direcionar as características catalíticas finais da lipase imobilizada (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; TACIAS-PASCACIO et al., 2016).

Alguns requisitos são importantes ao fazer uso da adsorção hidrofóbica como protocolo de imobilização enzimática. Mesmo com o uso de uma baixa força iônica, ocorrerá a purificação de lipases de outras enzimas. Em contrapartida, a alta força iônica torna o processo de imobilização mais lento, pois desfavorece a forma aberta da lipase e com isso não haverá a adsorção dessa via ativação interfacial, além de reduzir o processo de purificação enzimática. (CARVALHO et al., 2020; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014) Esse equilíbrio conformacional ao se utilizar forças iônicas distintas, como descrito na Figura 2.7.

Figura 2.7. Efeito da força iônica no equilíbrio conformacional de lipases imobilizadas via ativação interfacial ou utilizando suportes convencionais.



Fonte: (RODRIGUES et al., 2019)

A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é uma ferramenta rápida e acessível, podendo ser utilizada em uma ampla faixa de pH (embora a enzima deva ser solúvel e estável nessas condições), não requerendo qualquer tratamento enzimático. Contudo, um processo de dessorção da enzima pode ocorrer, ou seja, a enzima poderá ser liberada do suporte na presença de concentrações moderadas de detergente (JIN et al., 2018), o uso de elevadas temperaturas (RUEDA et al., 2015a) ou pela presença de co-solventes orgânicos (RUEDA et al., 2015b). No entanto, um detergente pode vir a ser um aliado nesse mecanismo de imobilização, caso seja objetivo da proposta de trabalho a reutilização do suporte limpo, ou seja, sem a presença da enzima (GARCIA-GALAN et al., 2011).

2.3.1.1 Co-precipitação de enzimas

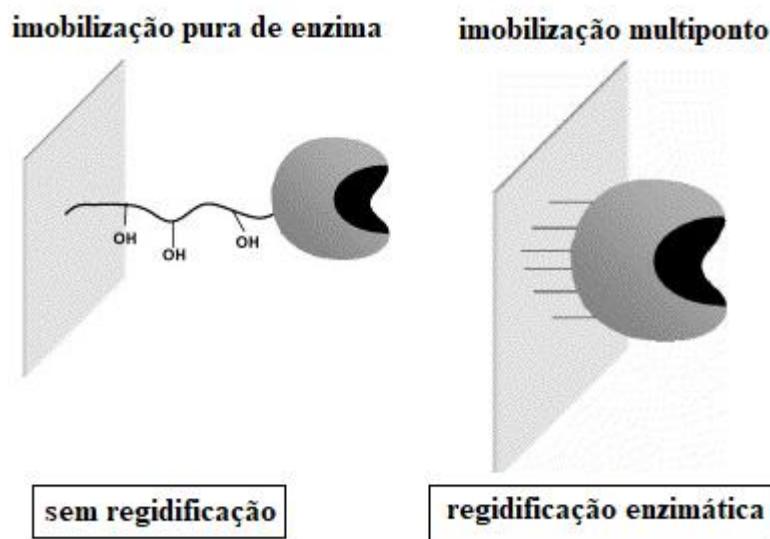
Um dos fenômenos utilizados na separação de proteínas a partir de altas concentrações de sais ao meio reacional é denominado “*salting-out*”. Esse mecanismo é utilizado a fim de otimizar o processo de imobilização da enzima ao suporte. Com o aumento da força iônica do meio, a partir da adição de grandes quantidades de sal, a enzima sofrerá um processo de precipitação, sendo adsorvida na matriz do suporte. (CHEN et al., 2007) Para realização desse efeito, a cromatografia de interação hidrofóbica promove separações rápidas entre espécies, mediante a modificação da solubilidade do meio e consequente precipitação proteica. Como mencionado, a solubilidade do meio reacional será afetada pois a água, no momento da adição do sal, irá interagir tanto com os íons dissolvidos pela constituição salina, quanto com a proteína. (QUEIROZ et al., 2007; ÜNLÜER; ÖZCAN; UZUN, 2014) Devido ao menor tamanho das partículas, as moléculas de água irão reagir com os íons do sal, estando as zonas hidrofóbicas da proteína livres para interagir com as regiões do suporte. Essa interação reversível enzima-suporte (mediante precipitação enzimática devido à diminuição da solubilidade do meio) terá influência não apenas da concentração do sal, mas principalmente da espécie salina empregada na solução tampão (OKUR et al., 2017).

2.3.2 Ligação covalente

A imobilização via interação covalente é uma das formas mais eficazes na produção de uma enzima mais rígida e estável. Esse mecanismo faz com que o suporte torne-se totalmente inerte após a imobilização da enzima, mantendo a conformação e as características da mesma através de apenas um ponto de ligação, sendo reconhecido por melhorar a estabilidade enzimática caso o mecanismo seja devidamente controlado. (ARANA-PEÑA et al., 2022a).

Nesse protocolo de estabilização enzimática, as posições dos grupos envolvidos nas interações devem permanecer fixos em qualquer condição experimental, onde apenas o braço espaçador apresentará um movimento (Figura 2.8). Esse mecanismo é realizado através de uma reticulação intramolecular multipontual, representada por uma estrutura plana e multifuncional constituída pela superfície de suporte ativada, onde esse deverá apresentar uma maior rigidez comparado à enzima, evitando assim o enrijecimento do suporte (GUISAN, 2013).

Figura 2.8 Efeito da imobilização na estabilidade da enzima.



Fonte: (MATEO et al., 2007)

A ligação covalente multipontual é uma estratégia bastante utilizada quando se faz necessário a utilização de um biocatalisador que apresente rigidez na sua estrutura. A matriz do suporte, representada por grupos funcionais com braços espaçadores curtos, reage com os nucleófilos enzimáticos de forma a manter as posições entre as interações, não havendo alteração da mudança conformacional (RODRIGUES et al., 2008, 2021). Contudo, a produção de uma intensa fixação multipontual requer condições experimentais específicas a fim de aumentar a reatividade dos grupos presentes nas proteínas inseridos próximos à superfície do suporte. O estudo de variáveis como o pH do meio, o tempo da reação bem como a temperatura, são fatores que podem interferir para que haja um aumento na formação da ligação covalente multipontual (MATEO et al., 2000a) .

A estabilização enzimática via ligação covalente multipontual requer algumas especificidades para sua obtenção, sendo as principais relacionadas tanto ao suporte (preferível a utilização de matrizes que apresente uma densidade significativa de grupos reativos), possibilidades de ativação do suporte, os braços espaçadores dos grupos presentes no suporte, como também as condições específicas de imobilização (algumas já cotadas anteriormente), no intuito de favorecer tanto os grupos presentes no suporte, quanto na flexibilidade da molécula protéica (DOS SANTOS et al., 2015d; GRAZÚ et al., 2010a; MATEO et al., 2002a, 2002b).

2.3.3 Reticulação

A técnica de reticulação é um método de baixo custo e simples que utiliza reagentes bi ou multifuncionais na produção de ligações covalentes entre a enzima e os grupos ativos, também conhecida por copolimerização (LEE et al., 2021). A preparação dos reticulados enzimáticos pode ser obtida por diversos reagentes, sendo os mais conhecidos o glutaraldeído, glicoxal, diisocianatos, hexametileno, tolueno diisocianato, dentre outros (ARANA-PEÑA et al., 2020a; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; MATEO et al., 2004a; VALDÉS; SOTO; ARCAYA, 2011). É uma técnica que não exige etapa de purificação da enzima, permitindo a estabilização de enzimas multiméricas, diminuindo os custos durante o processo, tornando a operação menos complexa (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; WILSON et al., 2006). Contudo seu uso deve ser evitado em enzimas puras pois as mesmas poderão sofrer desnaturação ou alteração na sua estrutura com a aplicação de reagentes, causando a perda da atividade catalítica (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; QIAN et al., 2020).

Essa estratégia de imobilização enzimática não necessita de um suporte preexistente, podendo ser obtida através da utilização de diferentes estratégias, como os biocatalisadores copolimerizados (POLLAK et al., 1980), os cristais de enzimas reticulados (CLECs) (CACICEDO et al., 2019; NAVIA; CLAIR; GRIFFITH, 1993) ou pelos agregados de enzimas reticuladas (CLEAs) (CACICEDO et al., 2019).

Como exemplificado anteriormente, o glutaraldeído vem a ser um dos reagentes mais comumente utilizado na técnica de reticulação devido ao baixo custo e de fácil acessibilidade ao ser usado em grandes quantidades (NEGM et al., 2020). É um reagente bastante utilizado na reticulação de proteínas por meio de ligações cruzadas através do grupo amino livre (MUZZARELLI, 2009), usado como ativador de suporte (ADRIANO et al., 2005) e como reticulador de enzima e suporte (DE MELO et al., 2017; RUIZ et al., 2001). Seu uso como reticulador baseia-se na capacidade de reagir consigo mesmo ou com grupos de proteínas que já tenham sido modificadas com uma molécula de glutaraldeído. Na reticulações proteicas, pode interagir intermolecularmente, ou seja, entre grupos colocados em diferentes moléculas de proteínas ou através de uma reticulação intramolecular, ou seja, entre grupos colocados presentes na mesma molécula (GABRIEL PAULRAJ et al., 2017; MIRZAEI B. et al., 2013; NAGIREDDI; KATIYAR; UPPALURI, 2017).

2.4 Suportes para imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas ou de proteínas é um requisito importante no intuito de utilizar esses biocatalisadores numa ampla gama de aplicações, nos quais suas propriedades serão direcionadas pelas características tanto da enzima como do suporte a ser utilizado (FERREIRA et al., 2018). A interação enzima/suporte produz um derivado com propriedades químicas, cinéticas, mecânica e bioquímica, onde o suporte utilizado pode ser um sólido inorgânico, um polímero orgânico sintético bem como um biopolímero (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999).

2.4.1 Polímeros naturais

Muitos suportes têm sido utilizados como ferramentas para uso de imobilização de enzimas, dentre eles uma variedade de polímeros naturais, como os polissacarídeos insolúveis em água, tais como celulose, amido, agarose e a quitosana (BILAL; IQBAL, 2019).

Em um estudo recente, um protocolo de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em esferas de octil-agarose via ativação interfacial através de 16 condições diferentes (alterando o pH de imobilização, a força iônica, a presença de aditivos) com uso de uma baixa carga enzimática (1 mg/g de suporte). Os biocatalisadores produzidos foram avaliados conforme a estabilidade em pH 7,0 e 70 °C e suas atividades medidas em distintos substratos (*p*- nitro fenil propionato, triacetina e R- e S- metil mandelato). Os autores constataram que as propriedades enzimáticas finais são determinadas pelas condições de imobilização, que alteraram a estabilidade da enzima em 10 vezes, atividade em 8 vezes usando R-metil mandelato e especificidade 0,7 para 2,3 usando ésteres de mandelato. A caracterização realizada a partir de estudos de fluorescência confirmaram que as enzimas imobilizadas apresentaram uma conformação diferente, apesar do método utilizado fosse de natureza física e, portanto, reversível. Os autores concluíram então que a imobilização de TLL em esferas de octil agarose sob diferentes condições reacionais produziu biocatalisadores com propriedades de características distintas (LOKHA et al., 2020a)

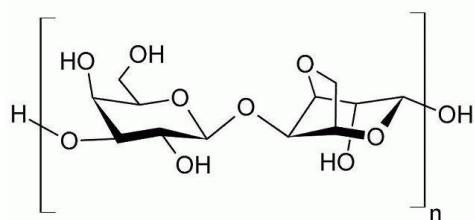
2.4.1.1 Agarose como suporte para imobilização enzimática

Alguns procedimentos, como é o caso da engenharia genética, vem sendo empregados para alcançar a estabilização de enzimas. Contudo, é provável que a estratégia mais utilizada para melhorar a estabilidade de enzimas seja com o uso de um suporte sólido poroso (sílica,

alumina, vidro, agarose ou celulose) immobilizados através de diferentes métodos (covalente, ligação iônica ou através da adsorção física) (CARBALLARES; ROCHA-MARTIN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; DE ANDRADES et al., 2019; FERREIRA et al., 2018).

A agarose tem por característica estrutural ser um hidrocolóide linear purificado e isolado a partir de algas marinhas. Estruturalmente, a agarose é um polissacarídeo (Figura 2.9) composto por 1,3-ligado a β -D-galactose e 1,4-ligado a 3,6- desidratado- α -L-pirano-galactose resíduos ligados alternadamente. É um composto que possui muitas vantagens, sendo representado por grupos hidroxila hidrofílicos, de fácil funcionalização, estabilidade, alta capacidade de ligação e poros adequados para difusão de macromoléculas (LIU et al., 2018).

Figura 2.9 Estrutura química da agarose.



Fonte: (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016a)

Dentre alguns agentes bifuncionais utilizados na reticulação de grânulos de agarose destaca-se a divinilsulfona, que fornece uma estrutura mais rígida ao suporte, embora não afete a porosidade dos géis. A utilização de condições experimentais adequadas promoverá a obtenção de um produto funcionalizado e reticulado, no qual o agente bifuncional (nesse caso a vinilsulfona) reaja apenas por uma extremidade, enquanto a outra permanece ativa para reagir com o grupo enzimático (PORATH; L»»S; JANSON, 1975).

As esferas de agarose também têm sido amplamente utilizadas a partir de sua modificação com grupamentos glioxila, sendo utilizados como instrumentos na immobilização e estabilização de enzimas (BECARO et al., 2020; BRAHAM et al., 2021a; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2016a; HIRATA et al., 2016). A primeira immobilização neste suporte é um processo multipontual, o que implica a área com a maior densidade de lisina residual mais do que a área em que se encontra o resíduo mais reativo, como, por exemplo, a do grupo amino terminal. Após a reação de immobilização, de agarose ativada com a enzima, uma redução com boro-hidreto de sódio é geralmente realizada a fim para se obter títulos de amino

secundários muito estáveis e para transformar a grupos aldeído residual no suporte em muito hidrofilico e grupos hidroxilo inertes. Assim, as moléculas com apenas um grupo amino não reagem significativamente com glioxil-agarose (RODRIGUES et al., 2009d).

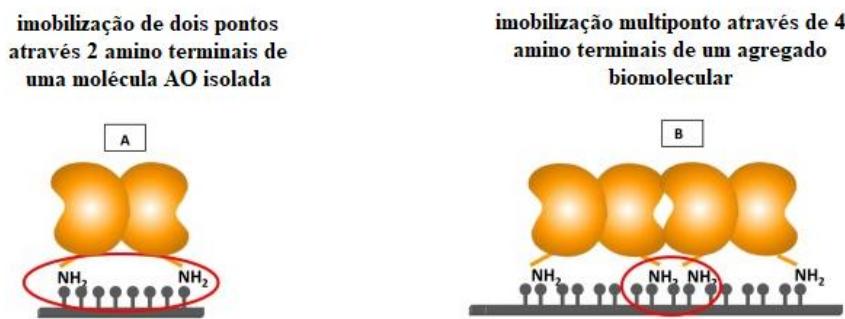
Um quesito de bastante interesse é a conformidade geométrica formada entre a enzima e o suporte. É relatado que quanto maior for a interação enzima-suporte, maiores serão as possibilidades para conseguir uma ligação intensa multipontual. No caso de esferas de agarose, que são formadas por uma associação não covalente entre polímeros de agarose formando grânulos de diâmetro relacionados com a concentração de agarose, quanto maior a concentração da agarose durante gelificação mais elevadas serão as possibilidades de alcançar uma intensa ligação covalente multipontual (BECARO et al., 2020; FERREIRA et al., 2018; SIAR et al., 2019).

2.4.1.2 Ativação do suporte para imobilização enzimática

A imobilização das biomoléculas pode ser realizada por meio de uma interação iônica ou hidrofobicamente. Entretanto, quando uma biomolécula é adsorvida fracamente a um suporte, faz-se necessário uma interação covalente para que haja redução desse processo de adsorção ou quando a estabilidade da enzima for questionada a longo prazo. Visando a melhora no rendimento de imobilização e estabilidade enzimática, o suporte pode passar por um processo de pré ativação/ funcionalização. (CARBALLARES; ROCHA-MARTIN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; GUERRERO; VERA; ILLANES, 2017; HIRATA et al., 2016; RIOS et al., 2019a; RUEDA et al., 2016c; SOUZA et al., 2021).

Uma abordagem alternativa baseia-se na pré-ativação do suporte para promover a formação de uma ligação covalente entre a biomolécula e o suporte sólido. Esse protocolo permite a fixação da enzima e captura dessa ao suporte, promovendo a estabilização através de interações multipontuais, ocasionando estabilidade ao biocatalisador, como mostrado na Figura 2.10 (GARCÍA-GARCÍA; FERNANDEZ-LORENTE; GUISAN, 2021).

Figura 2.10 Imobilização de um agregado bimolecular.



Fonte: (GARCÍA-GARCÍA; FERNANDEZ-LORENTE; GUISAN, 2021)

As principais vantagens na utilização de suportes pré ativados estão relacionadas ao fato de que a enzima/proteína não precisa ser alterada via modificação química ou biológica, fator que pode causar alteração na sua função biológica; não está limitado a proteínas recombinantes; é uma abordagem flexível, haja vista não ser necessário protocolos específicos antes da obtenção/purificação da enzima (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017b).

Um método para a imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi utilizado com o uso da agarose de amônio quaternário (QAA) e usada pela primeira vez na síntese de lactulose. Os autores obtiveram um biocatalisador com atividade específica de 24.690 UI, rendimento de imobilização de proteína de 97% e rendimento de imobilização de enzima de 76%. O suporte foi reutilizado sem alteração em sua capacidade máxima de carga enzimática e sem prejuízo no rendimento, produtividade e seletividade na síntese descontínua de lactulose com o biocatalisador resultante. Após a queda da atividade enzimática houve a dessorção da mesma no intuito da reutilização do suporte. O processo de reutilização do suporte foi constatado como importante do ponto de vista econômico e concluído que o processo de imobilização foi vantajoso pelo protocolo de interação iônica. (SEREY et al., 2021).

2.5 Outros suportes utilizados na imobilização enzimática

2.5.1 Polímeros inorgânicos

Uma grande variedade de materiais inorgânicos, classificados como materiais mesoporosos, como por exemplo sílica, zeólicas, sílicas mosoporosas (tais como MCM-41 e SBA-15, com um tamanho de poro entre 2 e 50 nm) são utilizados para uma ampla variedade de aplicações, como armazenamento de energia, componentes de baterias, entrega de fármacos e na área da catálise (GUAJARDO et al., 2015; KALLENBERG; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2005; SHEN et al., 2017). Em relação à área de biocatálise, são utilizados na imobilização de enzimas, para obtenção de poros de tamanho desejável (KARIMI, 2016).

2.5.2 Imobilizações em nano partículas magnéticas

A imobilização de enzimas em nano partículas magnéticas se dá através da funcionalização desse suporte (MNPs), onde são separados por decantação magnética, através de uma mistura reacional ou na presença de reatores de leito fluidizado estabilizado magneticamente. As MNPs funcionalizadas tornaram-se bastante utilizadas em áreas da biomédica e biotecnológicas. São representadas por um núcleo de óxido de ferro (Fe_3O_4) revestido com material polimérico ou, por exemplo, sílica que contém porções carbóxilo que poderão ligar a enzima à MNP (LONG et al., 2015).

A síntese enzimática de biodiesel via nanobiocatalisadores oferece uma opção ambientalmente mais atraente para a produção desse biocombustível. No trabalho de (KARIMI, 2016), nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) foram sintetizadas, cobertas por sílica e então enxertadas por grupos aldeídios a fim de imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia*, como um método promissor que aumenta a viabilidade econômica da transesterificação enzimática. Os resultados demonstraram que o tamanho médio de SPIONs foi determinado em torno de 20 nm. As nanopartículas ligadas às lipases apresentaram propriedades quase superparamagnéticas.

Nos estudos de (RAITA et al., 2015), a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Fe_3O_4 foi estudada usando diferentes modelos de ligação covalente. O

biocatalisador mostrou alta estabilidade operacional e pode ser simplesmente separado por magnetização e reciclado por pelo menos 5 ciclos consecutivos com > 80% de atividade restante, sugerindo seu potencial para aplicação na síntese biocatalítica de biodiesel (RAITA et al., 2015).

Uma nova estratégia para anexar nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ (NPs) sobre a lipase imobilizada comercialmente em resina acrílica é demonstrada no trabalho de (CHEN et al., 2016). A lipase carregada em Fe₃O₄ NPs magnética foi utilizada com sucesso como catalisador heterogêneo efetivo e reciclável para a produção de biodiesel a partir de óleo de soja. Além disso, os efeitos de diferentes solventes orgânicos no rendimento de metil éster de ácido graxo e a estabilidade da lipase imobilizada com Fe₃O₄ foram investigados. Um rendimento máximo de FAME de 44% pode ser alcançado após a otimização das condições de reação.

Capítulo 3

Imobilização da Penicilina G Acilase em Vinil Sulfona-Agarose: Um Efeito Inesperado da Força Iônica no Desempenho do Processo de Imobilização

3.1 Resumo

Penicilina G acilase (PGA) de *Escherichia coli* foi imobilizada em vinil sulfona (VS) agarose. A imobilização da enzima falhou em todos os valores de pH usando 50 mM de tampão, enquanto o aumento progressivo da força iônica permitiu sua rápida imobilização em todos os valores de pH estudados. Isso sugere que a moderada hidrofobicidade dos grupos VS é suficiente para transformar a VS-agarose em um suporte heterofuncional, ou seja, um suporte com características hidrofóbicas (capaz de adsorver as proteínas) e reatividade química (capaz de formar ligações covalentes). Uma vez que a PGA foi imobilizada neste suporte, a imobilização da PGA em VS-agarose foi otimizada com o objetivo de obter um biocatalisador estável e ativo, otimizando as etapas de imobilização, incubação e bloqueio características deste protocolo de imobilização. As condições ótimas foram a imobilização em 1 mol/L de sulfato de sódio a pH 7,0, incubação em pH 10,0 por 3 horas na presença de glicerol e ácido fenilacético e bloqueio final com glicina ou etanolamina. Isso produziu biocatalisadores com estabilidades semelhantes à do glioxil-PGA (o biocatalisador mais estável dessa enzima descrito na literatura), embora apresentando pouco mais de 55% da atividade enzimática inicialmente oferecida versus os 80% que é recuperado usando o glioxil-PGA. Esta heterofuncionalidade dos grânulos VS de agarose abre novas possibilidades para a imobilização de enzimas neste suporte.

Palavras-chave: Imobilização enzimática; Suportes heterofuncionais; Ligação covalente multiponto; Otimização de imobilização; divinilsulfona.

3.2 Introdução

As enzimas têm grande relevância no desenvolvimento de processos químicos verdes e sustentáveis por causa de sua alta atividade em condições amenas, e sua alta seletividade de produto e especificidade de substrato (SHELDON, R.A.; WOODLEY, J.M. 2018 ;WOODLEY, 2020; WOODLEY, 2022 ; ALCÁNTARA et al., 2022; SHELDON; BRADY, 2022). No entanto, as enzimas são biocatalisadores biológicos inadequados para muitos requisitos industriais. A estabilidade limitada de muitas enzimas naturais pode ser melhorada por diferentes técnicas, como evolução dirigida (REN et al., 2019a; SOCHA; TOKURIKI, 2013) ou mutagênese dirigida ao local (AKBARZADEH et al., 2018; FAN et al., 2018; MATELJAK et al., 2019a), e essas ferramentas também podem compensar sua baixa atividade com substratos muito diferentes de seus fisiológicos (HAN et al., 2018; LEE et al., 2018; WU et al., 2018; ZHAO; FENG, 2018; ZHENG et al., 2018). Atualmente, os pesquisadores podem até produzir enzimas com um centro ativo artificial adicional (as chamadas plurizimas), biológicas ou não (ALONSO et al., 2020; RODA et al., 2022; SANTIAGO et al., 2018). No entanto, outra limitação enzimática é a solubilidade aquosa da maioria das enzimas, o que torna complexa a sua recuperação e reutilização. A solução para a recuperação e reutilização de enzimas foi o objetivo inicial da imobilização de enzimas (DICOSIMO et al., 2013; IYER; ANANTHANARAYAN, 2008). Os pesquisadores mostraram que a imobilização também pode resolver algumas outras limitações enzimáticas. Imobilização enzimática adequada pode melhorar a estabilidade da enzima por diferentes métodos (prevenção de interações intermoleculares, rigidez da estrutura da enzima por ligação covalente multiponto, geração de um nanoambiente adequado, etc.) (RODRIGUES et al., 2021), e também alterar a atividade enzimática, seletividade ou especificidade, reduzir inibições ou ser acoplado à purificação enzimática (BARBOSA et al., 2015; BILAL et al., 2019b; BOLIVAR; LÓPEZ-GALLEGO, 2020; GARCIA-GALAN et al., 2011; LIESE; HILTERHAUS, 2013; MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; SCHMID-DANNERT; LÓPEZ-GALLEGO, 2019; WAHAB et al., 2020). A imobilização pode ser uma ferramenta poderosa no projeto de um biocatalisador industrial quando utilizada adequadamente (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022).

Um dos primeiros sucessos do uso de enzimas na biocatálise da indústria farmacêutica é a enzima penicilina G acilase (PGA) de *Escherichia coli*, usada para produzir o ácido 6-aminopenicilânico por hidrólise da penicilina G (MATSUMOTO, 1993; SELF et al., 1969;

WARBURTON; DUNNILL; LILLY, 1973). A enzima tem potencial para uso em muitas outras aplicações, como a síntese controlada termodinamicamente ou sinteticamente de antibióticos beta-lactâmicos semissintéticos, resolução de misturas racêmicas e etapas de desbloqueio em diferentes processos sintéticos, entre outros (ARROYO et al., 2003; BRUGGINK; ROOS; DE VROOM, 1998; CHANDEL et al., 2008; GIORDANO; RIBEIRO; GIORDANO, 2006; KASCHE; GALUNSKY, 1982; KASCHE; HAUFLER; ZÖLLNER, 1984; SCHUMACHER et al., 1986; VOLPATO; C. RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; ZMIJEWSKI et al., 1991b). A enzima é produzida como um monômero que é autoprocessado com duas subunidades diferentes (DUGGLEBY et al., 1995; KASCHE et al., 1999). A PGA sofre uma mudança de conformação induzida pela interação com o substrato doador de acila (fenil acético ou um análogo), que expõe o grupo catalítico ao meio, caso contrário o centro ativo não está em contato com o meio reacional (DONE et al., 1998b).

A enzima foi imobilizada em diversos suportes, e isso tem se mostrado um ponto crítico para ampliar seu leque de aplicações (KALLENBERG; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2005; SHELDON, 2007). Por exemplo, a PGA tem sido utilizada em alguns trabalhos pioneiros na imobilização de enzimas, como o desenvolvimento de agregados enzimáticos reticulados pelo grupo do Professor Roger Arthur Sheldon (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000), com o uso de glioxil agarose (ALVARO et al., 1990; GUISÁN, 1988), epóxido-Eupergit (MATEO et al., 2000a) ou epóxido-sepabeads (MATEO et al., 2002a), suportando a estabilização de enzimas via ligação covalente multiponto, e o uso de mutagênese direcionada ao local a fim de melhorar a imobilização da enzima (ABIAN et al., 2004; GRAZÚ et al., 2010b; GRAZU; LÓPEZ-GALLEGO; GUISÁN, 2012; MONTES et al., 2007a), pelo grupo do professor Jose Manuel Guisán. Biocatalisadores imobilizados com ligações multipontuais desta enzima têm sido utilizados para produzir antibióticos com sucesso na presença de altas concentrações de solvente orgânico (condições onde biocatalisadores de PGA não tão estabilizados tornaram-se rapidamente inativados) (FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISAN, 1996; FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1991; ROSELL et al., 1998).

No entanto, até o momento, a PGA não foi imobilizada/estabilizada em suportes ativados com grupos vinilsulfona. Esse suporte de imobilização foi recentemente relatado como muito adequado para a produção de intensa fixação multiponto de suporte enzimático (DOS SANTOS et al., 2015a; RODRIGUES et al., 2021). De fato, pode envolver não apenas grupos

amino primários da cadeia lateral de Lis e o(s) grupo(s) amino terminal(is) da proteína na imobilização da enzima, mas também grupos tióis, imidazol ou fenóis de Cis, His ou Tir, semelhantes a grupos epóxi (GRAZU; LÓPEZ-GALLEGO; GUISÁN, 2012; TURKOVÁ et al., 1978), mas melhorando a faixa de reatividade dos grupos glioxila, que reagem apenas com grupos amino primários (MATEO et al., 2005). O comprimento do braço espaçador é maior que o dos grupos glioxila, e isso tem um efeito duplo (RODRIGUES et al., 2021). Quando o braço espaçador é mais longo, ele tem mais mobilidade e pode atingir mais grupos na enzima, podendo produzir imobilização covalente multiponto mais intensa (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015d). No entanto, isso também tem um efeito negativo, pois cada grupo enzimático ligado por meio desse braço espaçador mais longo tem mais mobilidade, de modo que cada ligação adicional tem um efeito de rigidez menor na estrutura. A estabilização, comparada aos suportes de glioxil, depende da enzima específica, embora o número de ligações enzima-suporte deva ser maior (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015d). Como ponto final da reação, é necessária uma etapa de bloqueio para eliminar a reatividade química do suporte. Isso permite um ajuste final das características da enzima, pois a etapa de bloqueio pode determinar as interações enzima-suporte, que condicionam a estrutura final da enzima (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015c, 2015d, 2015e; SANTOS et al., 2015b) e as propriedades finais da enzima imobilizada. Isso inclui não apenas a estabilidade, especificidade e atividade da enzima (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015c, 2015d, 2015e; SANTOS et al., 2015b), mas também a via de inativação que a enzima segue durante a inativação (SOUZA et al., 2021). Uma camada de grupos vinilsulfona é hidrofóbica o suficiente para promover a imobilização de lipases em agarose-vinilsulfona via ativação interfacial (DOS SANTOS et al., 2015d). Estas enzimas têm uma afinidade especial por suportes hidrofóbicos devido à sua função natural (VERGER, 1997a), e isso tem sido explorado para desenvolver protocolos específicos de imobilização de lipase (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019).

A preparação da imobilização de uma enzima em suporte de vinilsulfona tem pelo menos três etapas (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015c, 2015d; FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1991; MATEO et al., 2005; TURKOVÁ et al., 1978). A primeira são as condições de imobilização (geralmente o valor do pH de imobilização é estudado), que são determinadas pelo local onde a enzima é fixada ao suporte. Isso estabelece a orientação da enzima no suporte e a área que estará envolvida nas reações enzima-suporte. A segunda são as condições de incubação, na qual a enzima já

imobilizada reage com o suporte, o que determina a intensidade da ligação multiponto enzima-suporte. A última é a etapa de bloqueio, na qual os grupos vinilsulfona restantes reagem com diferentes nucleófilos para evitar reações covalentes indesejadas de suporte de enzima durante a operação. Esta etapa determina as interações finais enzima-suporte (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015c, 2015d; FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1991; MATEO et al., 2005; TURKOVÁ et al., 1978).

Então, o objetivo deste estudo foi imobilizar PGA de *E. coli* em agarose-vinilsulfona (VS) e estudar os efeitos de estabilização dessa imobilização. As esferas de agarose foram escolhidas por representarem um suporte poroso hidrofílico e inerte, devendo os únicos grupos capazes de interagir com a enzima serem os introduzidos pelo pesquisador, no caso a vinilsulfona (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016b). Dentre as estratégias para determinar a estabilidade enzimática, estudou-se essa medição de perdas de atividade em condições de estresse térmico, considerando que a enzima era mais estável quando essas perdas de atividade eram menores que as reportadas na literatura (DA ROCHA et al., 2022a).

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Materiais

A PGA foi adquirida da Merck (Madrid, Espanha) na forma de solução aquosa (com valor médio de 86 ± 8 mg de proteína por mL e 3,4 U/mg). Ácido fenilacético, ácido 6-nitro-3-(fenil acetamido) benzóico (NIPAB), etilenodiamina (EDA), glicina, etanolamina, cisteína, glicose, aspártico e β -mercaptoetanol também foram adquiridos da Merck. Sepharose® 4BCL foi adquirido da ABT (Madrid, Espanha). A divinilsulfona (DVS) foi fornecida pela Thermo Fisher Scientific (Madrid, Espanha). O kit Protein Assay Dye Reagent foi adquirido da Bio-Rad (Alcobendas, Espanha). Todos os outros reagentes foram de grau analítico. O biocatalisador glioxil-PGA (com uma carga de enzima de 2,5 mg/g) foi usado como referência, sendo descrito como um dos mais estáveis na literatura (BRAHAM et al., 2021b; MATEO et al., 2002a; MORELLON-STERLING et al., 2021a). Para o preparo desse, a PGA foi diluída em carbonato de sódio 50 mM contendo ácido fenilacético 100 mM/glicerol a 30% (*v* / *v*) com o pH ajustado para pH 10,05. Em seguida, 10 g de grânulos de glioxil-agarose foram adicionados sob agitação suave. Após 3 horas, foi adicionado borohidreto sólido para atingir a concentração de 1 mg/mL e, após 30 minutos, o biocatalisador foi filtrado a vácuo e lavado com acetato de sódio 100 mM a pH 5,0 e com excesso de água destilada

usando um filtro sinterizado. O rendimento da imobilização foi de 100% e a atividade expressa foi de 80%.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Ensaio de atividade enzimática

Um espectrofômetro com agitação magnética (200 rpm) foi utilizado para determinar as atividades enzimáticas a uma temperatura controlada de 40 °C. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade (μmol) de substrato hidrolisado por minuto pela massa indicada de enzima livre ou biocatalisador imobilizado nas condições do ensaio. O ácido 4-etil-3-nitro-benzóico (NIPAB) foi usado na determinação da atividade enzimática de PGA conforme descrito por Kutzbach e Rauenbusch (KUTZBACH; RAUENBUSCH, 1974). O substrato foi preparado em fosfato de sódio 50 mM a pH 7,5 na concentração de 0,15 mM. Suspensão enzimática (100–200 μL) ou enzima solúvel foi usada no meio reacional para inicializar a reação. A atividade foi medida após o aumento da absorbância a 405 nm causado pela hidrólise do NIPAB (ϵ nessas condições é $8730 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3.3.2.2 Determinação da Concentração de Proteína

A concentração de uma preparação comercial de PGA foi determinada usando o método descrito por Bradford com algumas modificações (BRADFORD, 1976a). Um mililitro de uma diluição de 1:5 de Protein Assay Dye Reagent Concentrate foi colocado em uma cubeta de 1 cm de largura. Vinte e cinco microlitros da amostra em diferentes diluições foram adicionados e misturados. A solução foi incubada por 5 minutos à 25 °C. Em seguida, a absorbância foi medida a 595 nm. Uma curva de calibração foi determinada usando BSA em diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7 e 0,9 mg/mL).

3.3.2.3. Preparação de gel de agarose VS

Esferas de agarose foram ativadas pela mistura de 200 mL de carbonato de sódio 0,333 M em pH 11,5 com 7,5 mL de divinilsulfona sob agitação vigorosa até que uma solução homogênea fosse obtida (MORELLON-STERLING et al., 2021b). Em seguida, adicionou-se uma massa de 10 g de grânulos de agarose e a suspensão foi submetida a agitação suave por 2 horas. Em seguida, o suporte de VS ativado foi filtrado a vácuo com um funil de vidro sinterizado, lavado 10 vezes com água destilada e armazenado a 4–6 °C.

3.3.2.4. Imobilização de PGA em grânulos de agarose de vinilsulfona

Em todos os experimentos, a PGA foi imobilizada a uma taxa de carga de 2,5 mg/g de suporte. Uma suspensão de referência foi preparada usando grânulos de agarose inertes (a enzima não foi imobilizada neste suporte). Todos os cursos de imobilizações foram seguidos pela medição da atividade NIPAB na suspensão, sobrenadante e suspensão de referência. A atividade no sobrenadante dividida pela atividade na suspensão de referência deu uma medida precisa do rendimento da imobilização, ou seja, a porcentagem de enzima que foi imobilizada. Calculou-se o rendimento de imobilização (porcentagem de enzima imobilizada no suporte) e a atividade expressa (atividade observada dividida pela esperada a partir do rendimento de imobilização) (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Os ensaios de imobilização foram realizados na proporção de 1 g de suporte para 10 mL de solução enzimática, sendo a PGA diluída em solução de fosfato de sódio 50 mM a pH 7,0 e pH 8,0, ou em solução de carbonato de sódio 50 mM a pH 9,0. Em alguns casos, alguns sais (cloreto de sódio, fosfato de sódio ou sulfato de sódio) foram adicionados. Após a imobilização da enzima, os biocatalisadores foram filtrados e lavados com o tampão utilizado na etapa de incubação (50 mM de fosfato de sódio em pH 7,0 ou 8,0, ou 50 mM de carbonato de sódio em pH 9,0 ou 10,0) e os biocatalisadores foram ressuspensos nestas condições para tempos diferentes para permitir ligação covalente multiponto, adicionando 30% de glicerol (*v/v*) e 100 mM de ácido fenilacético para prevenir a inativação da enzima (ABIAN et al., 2002; FERNÁNDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1991). Após os tempos desejados, e para finalizar a reação enzima-suporte, os biocatalisadores foram lavados com água destilada e ressuspensos em soluções 2 M de diferentes nucleófilos (etilenodiamina, glicina, etanolamina, cisteína, glicose, aspártico ou β -mercaptoetanol) em fosfato de sódio 100 mM a pH 8,0 durante 48 horas para bloquear os restantes grupos VS no suporte. Amostras foram retiradas para verificar a atividade enzimática durante todo o processo.

3.3.2.5. Inativação Térmica dos Diferentes Biocatalisadores

A fim de realizar o estudo de estabilidade térmica, os diferentes biocatalisadores foram inativados por incubação em 50 mM Tris-Cl a pH 8,0 em banho-maria com temperatura fixada em 65 °C. Periodicamente, as amostras foram coletadas e suas atividades residuais

foram determinadas usando o ensaio NIPAB descrito acima, considerando a atividade inicial da preparação como 100% e referenciando a atividade das outras amostras a esse valor inicial como uma porcentagem.

3.4 Resultados

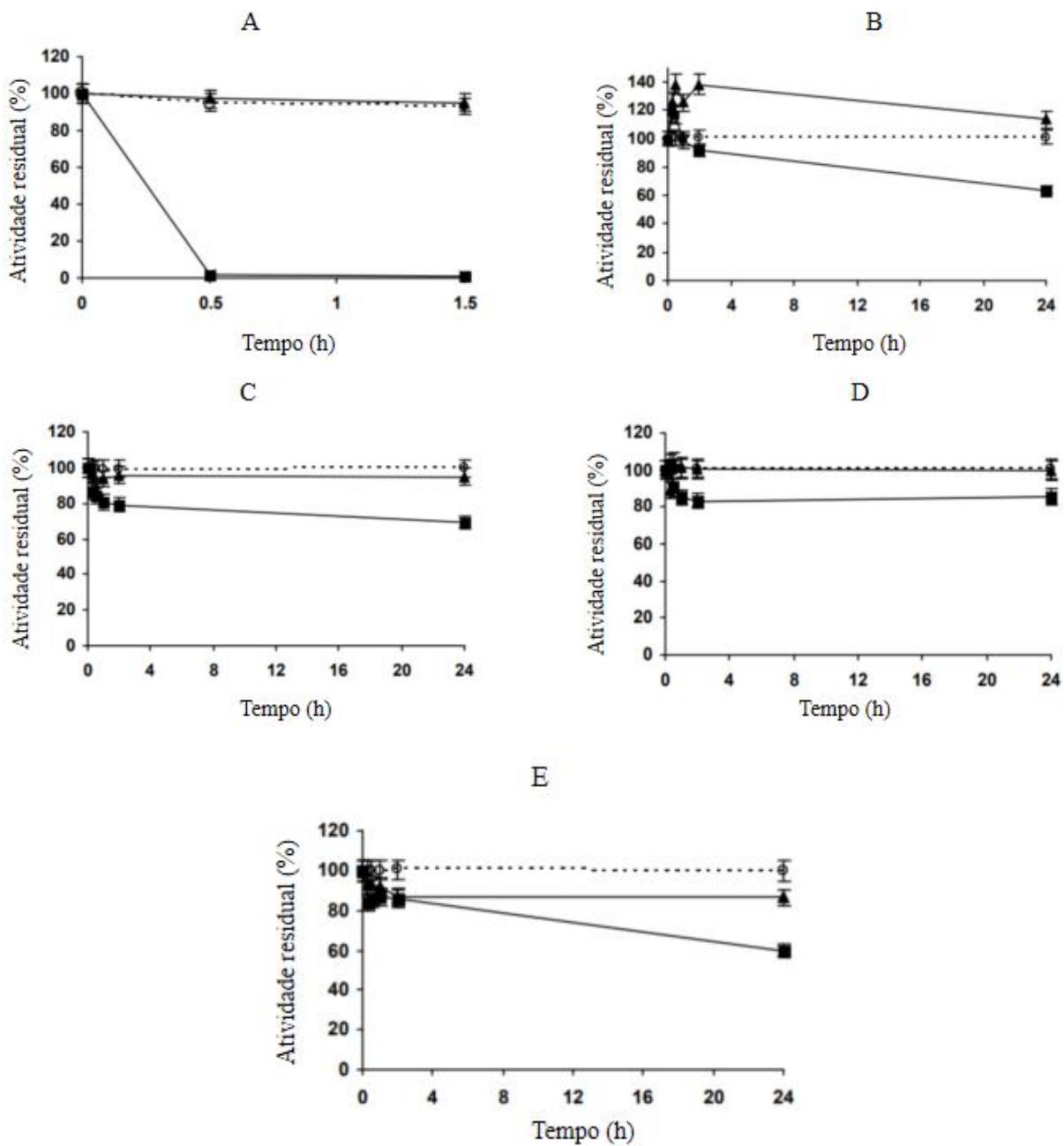
3.4.1 Imobilização de PGA em grânulos de agarose VS

Em um ensaio inicial, tentou-se imobilizar a enzima em um suporte de VS e glioxila na proporção de 1/10. Em trabalhos anteriores, foi verificado que essa enzima demonstrou ser imobilizada muito rapidamente em glioxilagarose (ALVARO et al., 1990), mesmo quando esse suporte requer o estabelecimento simultâneo de várias ligações enzima-suporte para fixar a enzima ao suporte (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993). A Figura 1 A mostra a rápida imobilização de PGA no suporte de glioxilagarose (toda a atividade de PGA foi imobilizada no primeiro ensaio de determinação de atividade durante um período de 30 min). No entanto, a imobilização no suporte agarose-vinilsulfona foi muito mais lenta em todos os valores de pH testados (incluindo pH 10,0), com rendimentos de imobilização abaixo de 10%, mesmo após 24 horas de imobilização (Figura 1B-E).

O suporte de glioxil apenas imobiliza a enzima por meio de uma multi-reação com vários grupos amino primários não protonados (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993) e a vinilsulfona pode imobilizar a enzima por apenas uma ligação, envolvendo muitos mais grupos (His, Tir por exemplo) na reação com o suporte (DOS SANTOS et al., 2015d). Isso concorda com outros relatos em que enzimas que poderiam ser imobilizadas em suportes de glioxila não foram imobilizadas em suportes vinilsulfona (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015c; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993), e sugere que a imobilização em suportes ativados por VS pode ser um processo mais complexo do que apenas a reação covalente entre nucleófilos na enzima e os grupos VS no suporte.

Em alguns casos, observou-se que a atividade da suspensão aumentou ligeiramente durante os primeiros momentos da imobilização (por exemplo, em pH 7,0, Figura 3.1 B), o que pode ser causado por distorções da estrutura da enzima com efeitos positivos sobre a atividade enzimática (DOS SANTOS et al., 2015d; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018).

Figura 3.1. Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em vinil sulfona agarose em diferentes valores de pH. (A) Imobilização em suporte de glixilagarose em pH 10,0; (B): imobilização em agarose-VS a pH 7,0; (C) imobilização em agarose-VS a pH 8,0; (D) imobilização em agarose-VS a pH 9,0; (E) imobilização em VS-agarose a pH 10,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.

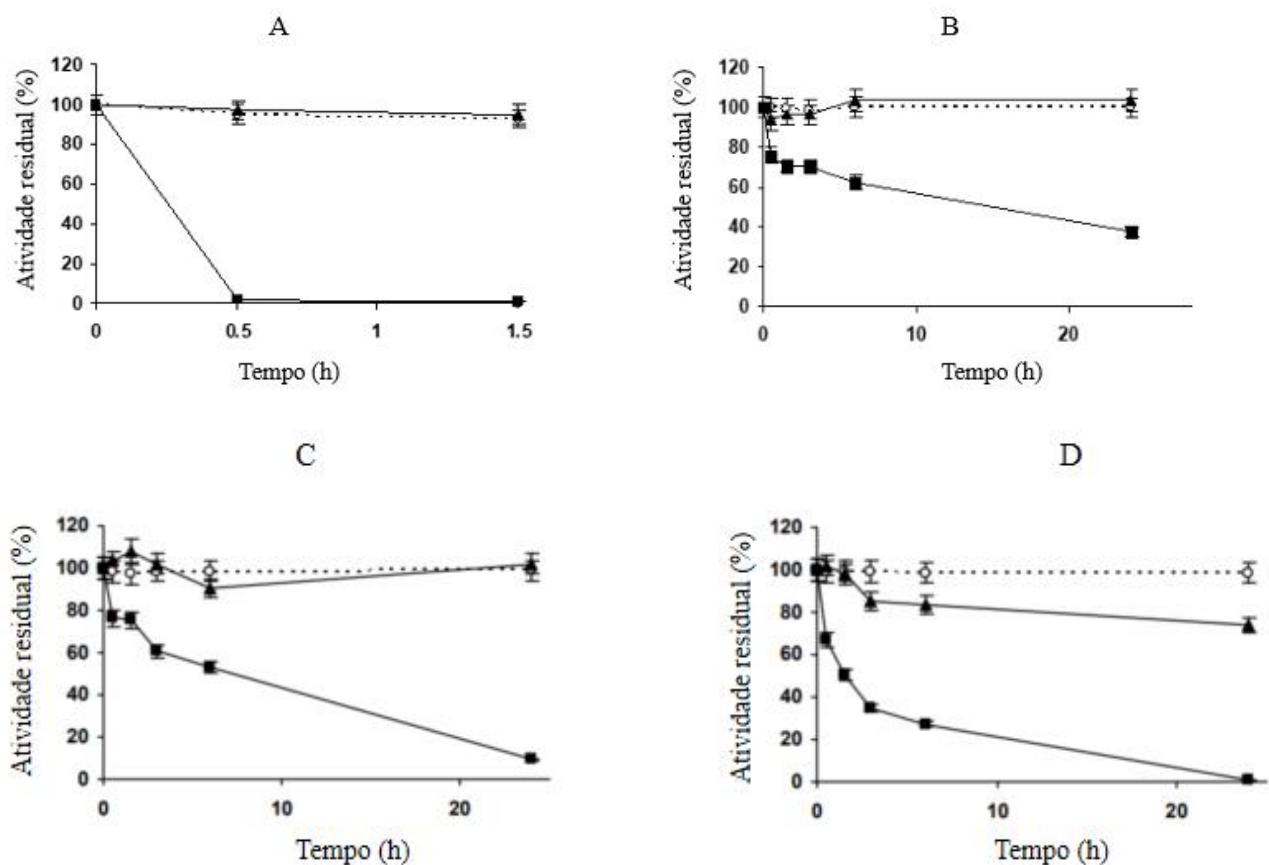


Fonte: Elaborada pela autora.

Para imobilizar uma porcentagem maior de atividade enzimática e ter uma atividade alta o suficiente para verificar pelo menos a estabilidade da enzima imobilizada, concentrarmos a enzima e o suporte usando uma solução de enzima volume:massa de suporte de 3:1 (Figura 3.2). Com glixil-agarose, a imobilização permaneceu completa nos primeiros 30

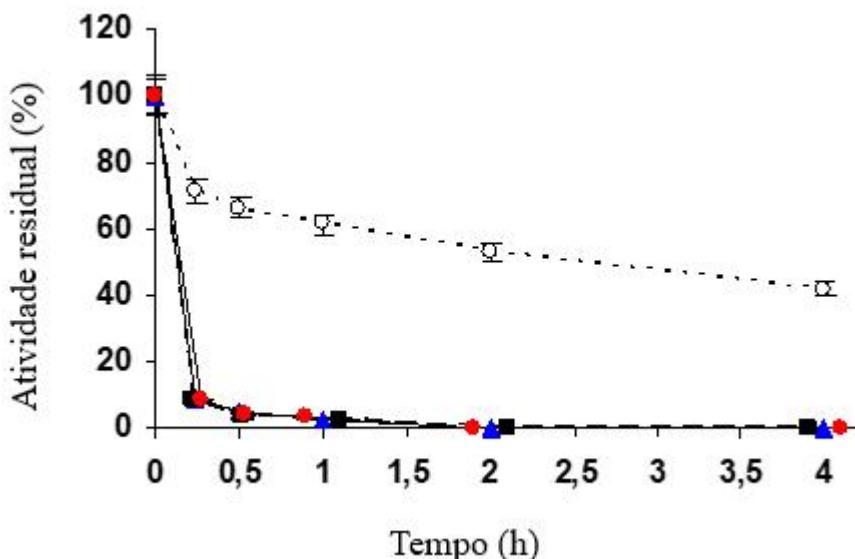
minutos de curso de imobilização (Figura 3.2 A). Contudo, esse cenário não ocorreu para a imobilização da enzima no suporte de vinilsulfona agarose, no qual o rendimento de atingiu um valor de 50% após 1,5 horas em pH 9,0, com rendimentos de imobilização menores em pH 8,0 ou 7,0 (Figura 3.2 B–D). A imobilização foi quase total após 48 h em pH 7,0 ou após 24 h em pH 8,0 e 9,0. Após os tempos pré-determinados, os biocatalisadores foram bloqueados usando glicina e suas estabilidades foram determinadas. Os cursos de inativação na Figura 3.3 mostram uma baixa estabilidade da enzima imobilizada em suporte VS quando comparada com glioxil-PGA. Todos os cursos de inativação do PGA imobilizado com vinilsulfona são sobreponíveis, independentemente da condição de imobilização. Isso sugere que essa estratégia de imobilização não foi adequada para imobilizar ou estabilizar a PGA.

Figura 3.2. Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em vinil sulfona agarose em diferentes valores de pH na proporção de 1 g de suporte para 3 mL de solução enzimática. (A) imobilização em suporte de glioxilagarose; (B) imobilização em VS-agarose a pH 7,0; (C) imobilização em VS-agarose a pH 8,0; (D) imobilização em VS-agarose a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3.3. Cursos de inativação térmica de PGA immobilizado em diferentes valores de pH. A enzima foi immobilizada, na proporção de 1 g de suporte para 3 mL de solução enzimática. A incubação foi realizada em carbonato de sódio 50 mM a pH 9,0 durante 3 h e bloqueada com glicina 2 M a pH 8,0 durante 48 h. Círculos vazios com linha tracejada: glioxilagarose-PGA. Triângulos em azul com linha sólida: immobilização em pH 7,0. Quadrados inteiros com linha sólida: immobilização em pH 8,0. Círculos vermelhos com linha sólida: immobilização em pH 9,0. Outras especificações são descritas nos Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

O caráter hidrofóbico da camada VS, que dificultou a immobilização de lipases em trabalhos anteriores (DOS SANTOS et al., 2015c), aqui verificou-se como uma nova oportunidade. Se essa hidrofobicidade for alta o suficiente para permitir a adsorção hidrofóbica da PGA (pelo menos uma adsorção parcial) no suporte em uma força iônica onde a enzima permanece solúvel e ativa, uma nova conjuntura pode ser analisada. O suporte agarose-VS pode se comportar como um suporte heterofuncional (ALBUQUERQUE et al., 2016), permitindo uma primeira immobilização da enzima via interações hidrofóbicas, e então permitindo a reação covalente enzima-suporte. O uso de suportes ativados com vinilsulfona e outras porções capazes de produzir a adsorção prévia da enzima (por exemplo, octil-VS, amino-VS) têm obtido sucesso na immobilização de enzimas que não immobilizam em suportes VS monofuncionais (ALBUQUERQUE et al., 2016; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018). Para analisar se a adsorção prévia da enzima na superfície do suporte poderia facilitar a immobilização covalente do PGA neste suporte, foi estudado o efeito da força iônica na immobilização do PGA em suportes VS.

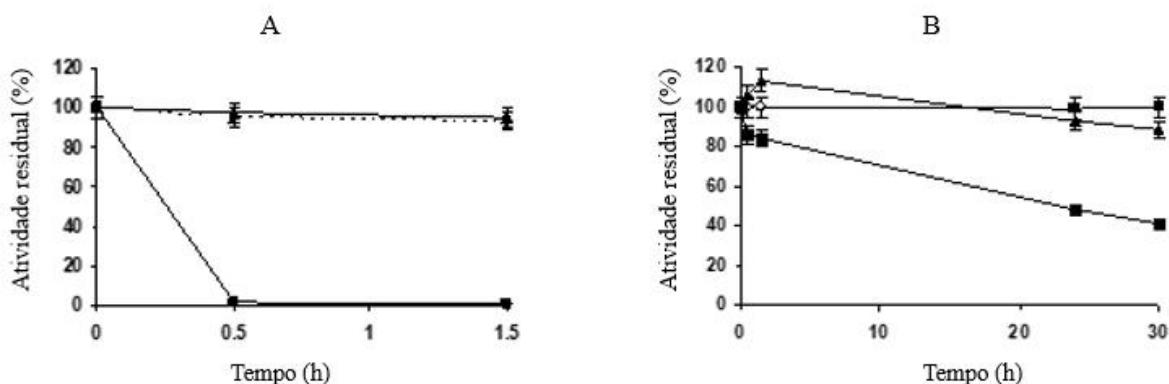
3.4.2 Efeito da força do íon na immobilização de PGA em grânulos de agarose de vinilsulfona

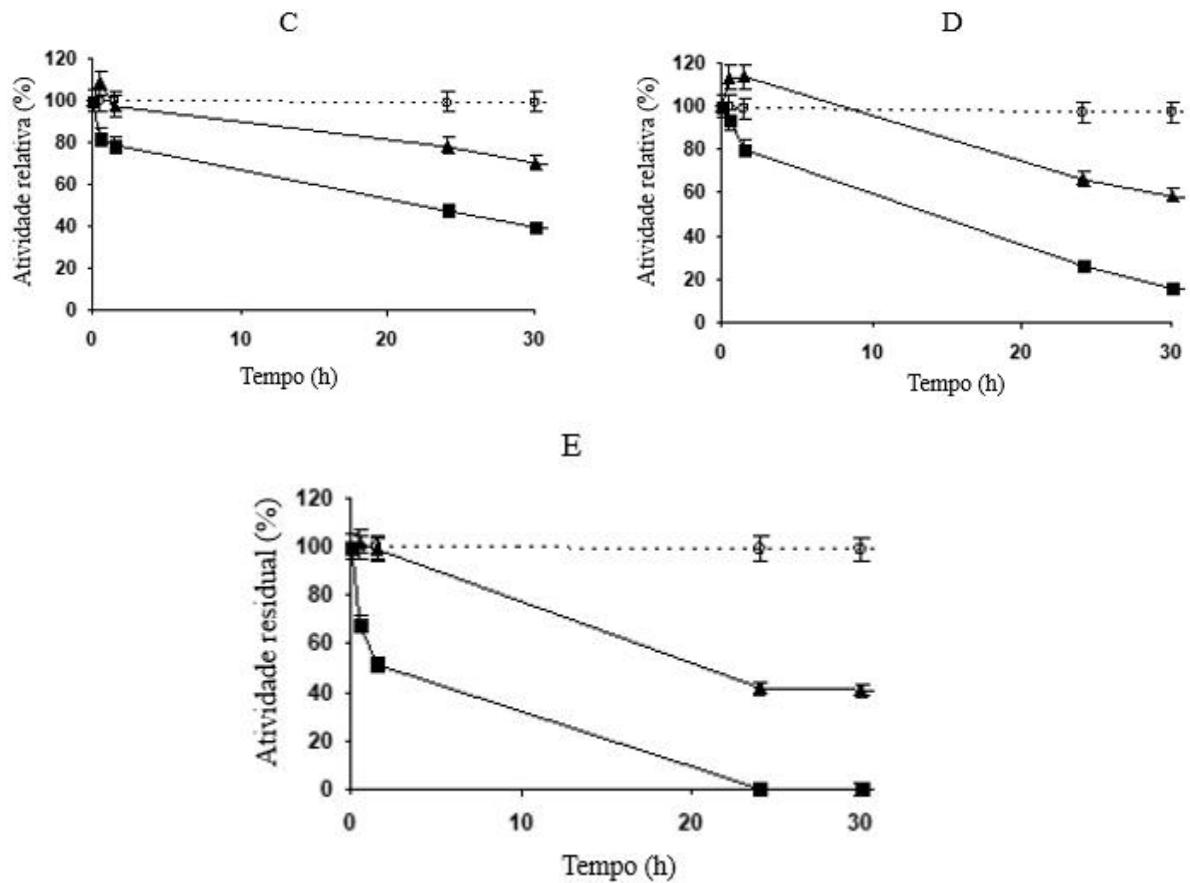
Como verificado na seção anterior, não houve um rendimento significativo no processo de immobilização da enzima PGA no suporte de agarose-VS. Visando promover uma

interação inicial da enzima no suporte por adsorção e, dessa forma, facilitar posteriormente a ligação covalente, foi realizado o estudo da presença de diferentes íons (força iônica) a fim de acelerar esse processo. É visto que condições reacionais que apresentam elevada força iônica, por meio da adição de grandes quantidades de sal, será verificado um fenômeno de insolubilização da proteína denominado efeito “*salting-out*” (BAI et al., 2023; KRISTIANSEN; PEDERSEN; ZACHARIASSEN, 2008; YANG; XIONG; JIANG, 2023). Nesse fenômeno, a água irá interagir com as duas espécies do meio, a proteína e os íons resultantes da dissociação salina. Devido ao menor tamanho de partícula provenientes dos íons, a água reage com as espécies iônicas, estando as moléculas protéicas livres em solução. Assim, haverá uma maior interação entre as estruturas proteicas, havendo a consequente precipitação dessas devido a baixa solubilidade em meio aquoso.

Dessa forma, as Figuras 3.4, 3.5 e 3.6 mostram, respectivamente, os cursos de imobilização da PGA em VS-agarose em diferentes concentrações de sulfato de sódio, fosfato de sódio e cloreto de sódio (usando uma relação de 1/10) em pH 8,0. De acordo com o que foi observado nas figuras vê-se que o rendimento de imobilização de 100% foi alcançado após apenas 30 minutos empregando sulfato de sódio ou fosfato de sódio 1 mol/L, com uma imobilização menos eficaz usando NaCl 1 mol/L. Considerando a atividade dos biocatalisadores finais e a simplicidade de preparo das soluções, outros estudos foram realizados utilizando sulfato de sódio 1 mol/L.

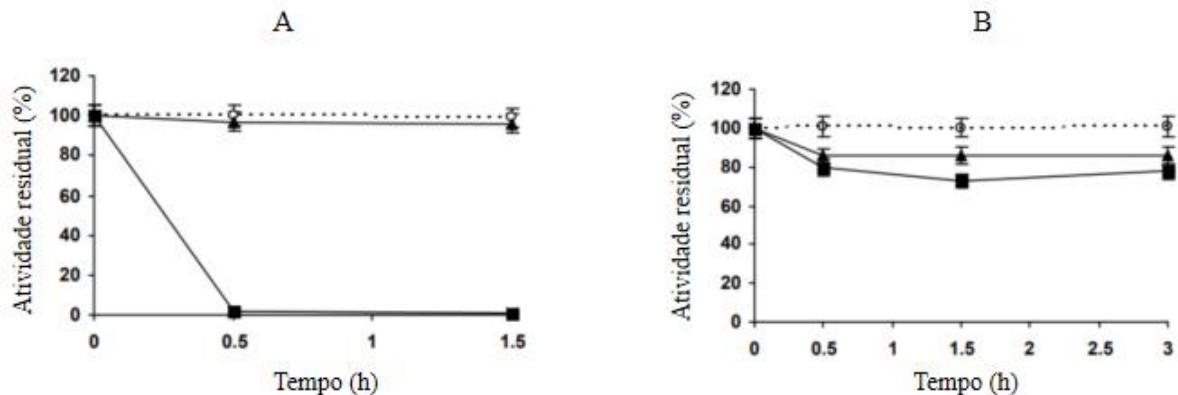
Figura 3.4. Cursos de imobilização em glioxil agarose (A) e em vinil sulfona agarose em diferentes concentrações de fosfato de sódio em pH 8,0, 25 °C. (B) 25mM; (C) 250 mM; (D) 500 mM; (E) 1 M. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.

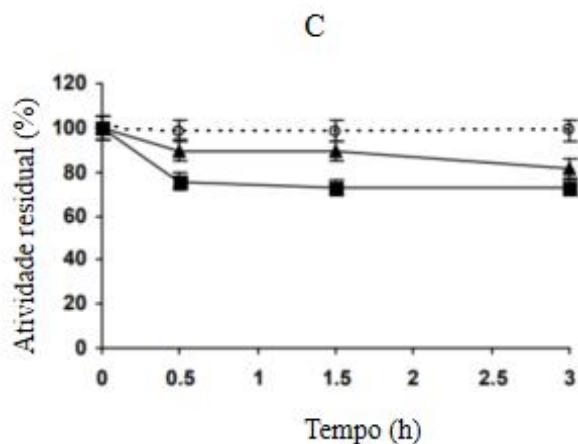




Fonte: Elaborada pela autora.

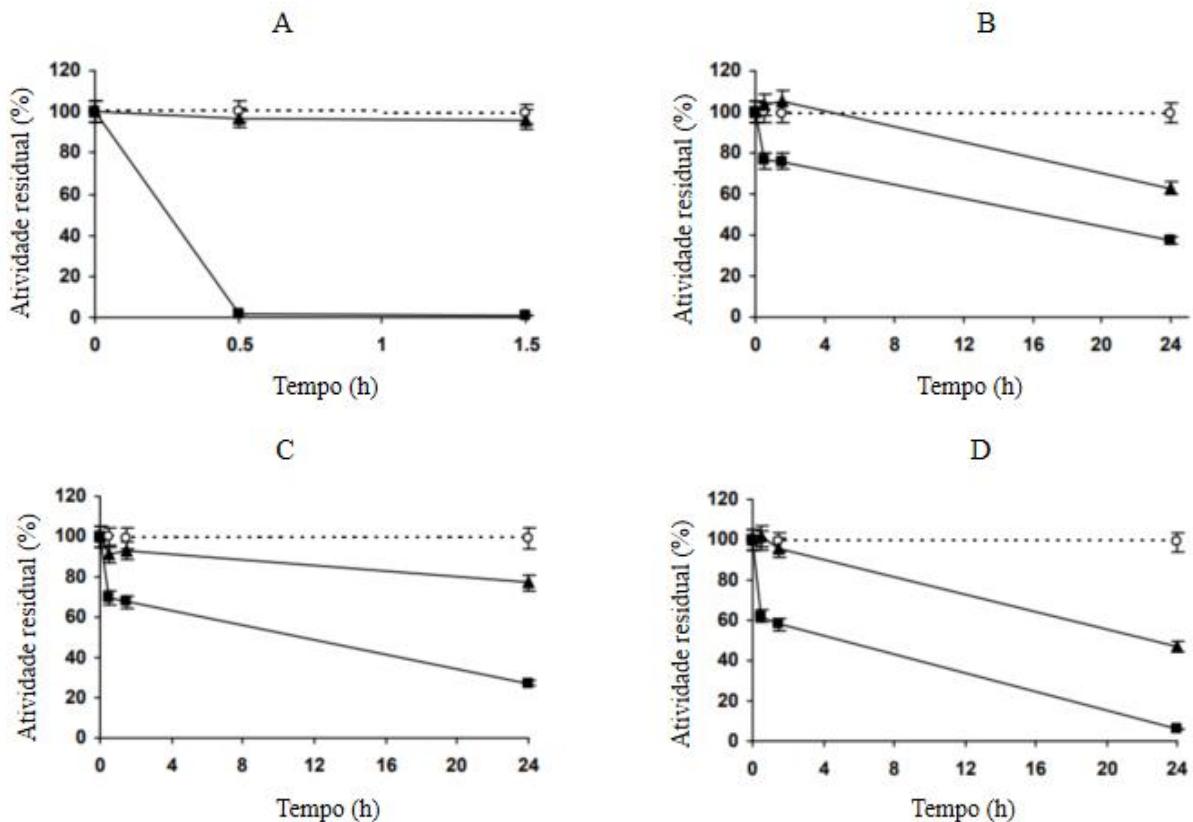
Figura 3.5. Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em glioxil agarose (A) e em vinil sulfona agarose em diferentes concentrações de cloreto de sódio a pH 8,0, 25 °C. (B) 500 mM; (C) 1 M. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.

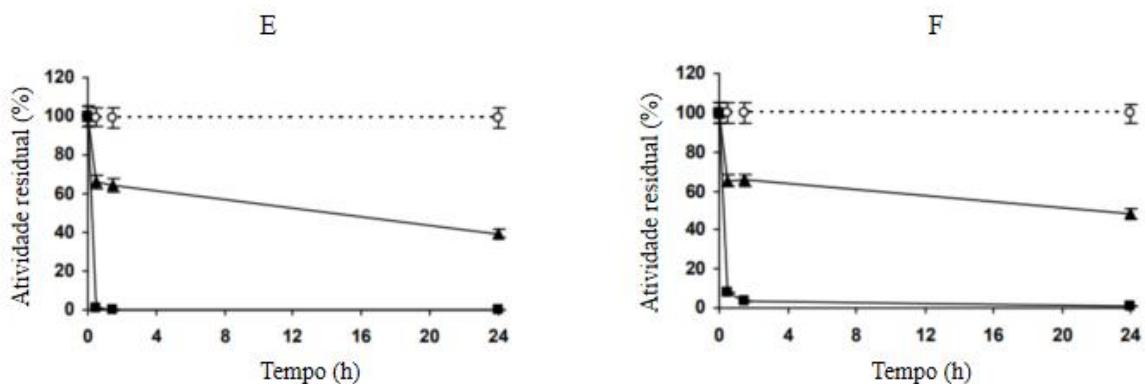




Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3.6. Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em gioxil agarose (A) e em vinil sulfona agarose em diferentes concentrações de sulfato de sódio a pH 8,0, 25 °C. (B) 100 mM; (C) 250 mM; (D) 500 mM; (E) 1 M; (F) 2 M. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.

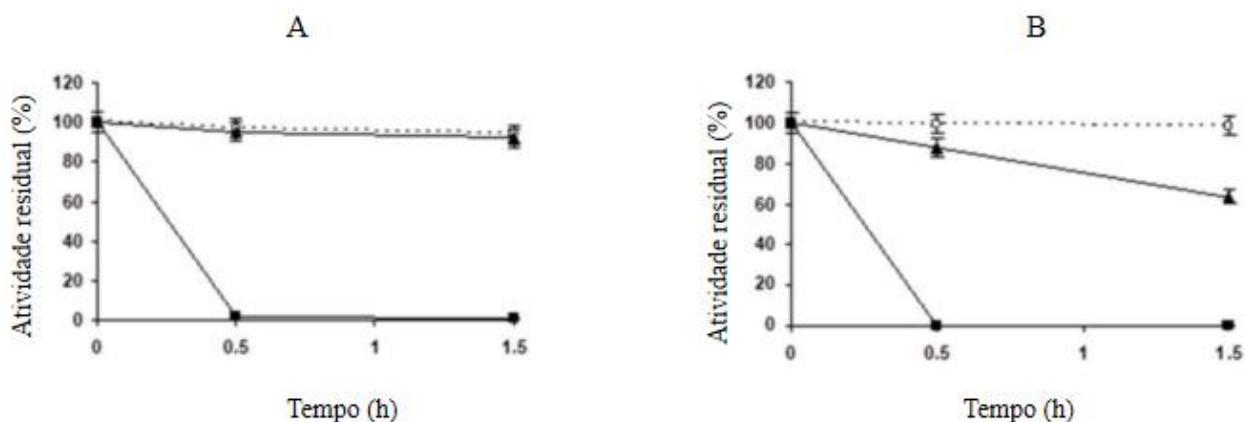


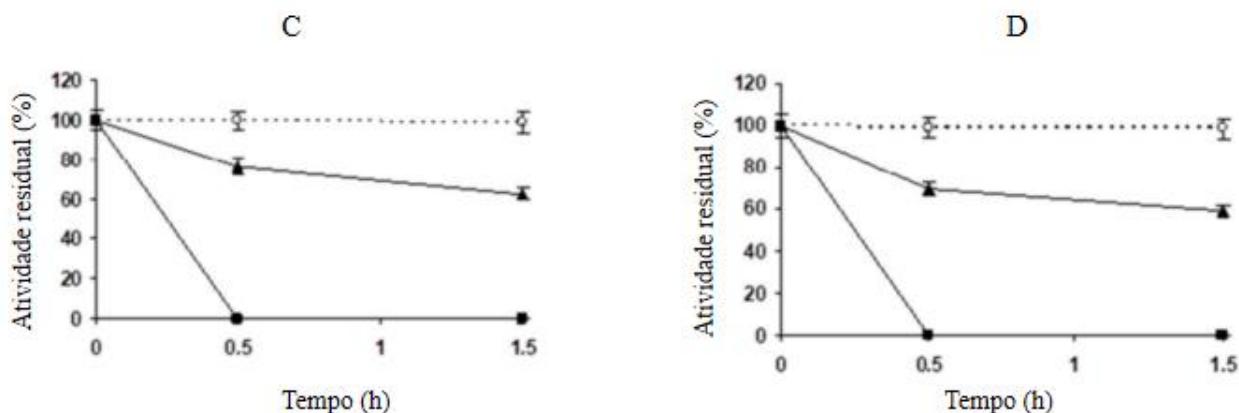


Fonte: Elaborada pela autora.

Tendo em vista os resultados referentes ao curso de imobilização em sulfato de sódio, a PGA foi imobilizada em pH 7,0, 8,0 e 9,0 em VS-agarose (Figura 3.7). Sob esta concentração de sulfato de sódio, a PGA pode ser totalmente imobilizada em VS-agarose mesmo em pH 7 (Figura 3.7 B).

Figura 3.7. Cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em glioxilagarose (A) e em vinil sulfona em sulfato de sódio 1 M a 25 °C em diferentes valores de pH. (B) pH a 7,0; (C) pH a 8,0; (D) pH a 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha sólida: sobrenadante. Outras especificações são descritas em Métodos.





Fonte: Elaborada pela autora.

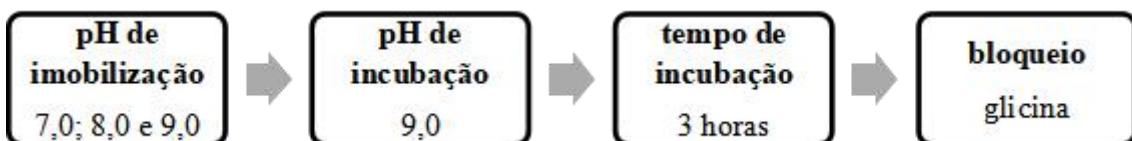
A imobilização covalente foi tão rápida após a adsorção da PGA que quando tentou-se liberar a enzima do suporte, nenhuma enzima foi liberada desde o início do processo de imobilização (mesmo usando detergentes). Este resultado parece apoiar a hipótese de que a enzima foi primeiramente imobilizada por meio de interações hidrofóbicas em alta força iônica e, em seguida, uma reação covalente entre a enzima e o suporte foi produzida. A partir disso, realizou-se o estudo dos efeitos das variáveis de imobilização, incubação, tempo de incubação e bloqueio nas características finais deste biocatalisador.

3.4.3. Efeito de diferentes condições experimentais das diferentes etapas da preparação do biocatalisador PGA-VS-Agarose em suas características finais

3.4.3.1. Efeito do pH de imobilização

Considerando que a primeira etapa da imobilização parece ser a adsorção hidrofóbica da enzima no suporte, é possível que o efeito do pH da imobilização no desempenho final da enzima seja menor do que em outros casos onde esta alteração da reatividade dos grupos enzimáticos com o suporte pode alterar a orientação final da enzima (DOS SANTOS et al., 2015c). Para tanto, a enzima foi imobilizada em pH 7,0, 8,0 ou 9,0, mantendo-se a etapa de incubação em pH 9,0 na presença de ácido fenilacético 100 mM/glicerol a 30% (para minimizar a inativação da enzima) (ABIAN et al., 2002; FERNÁNDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1998; GRAZU; LÓPEZ-GALLEGOS; GUISÁN, 2012) por 3 horas e bloqueando o biocatalisador com glicina, como visualizado no Esquema 3.1.

Esquema 3.1. Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi estudada de acordo com os pH's 7,0, 8,0 e 9,0. O pH de incubação em 9,0, tempo de incubação por 3 horas e o bloqueio com glicina 2 mol/L, permaneceram os mesmos para todos os biocatalisadores.



Fonte: Elaborada pela autora.

A etapa de incubação foi idêntica para todos os três biocatalisadores, sendo o pH de imobilização a única diferença, permitindo a mesma reatividade enzima-suporte durante a incubação (o tempo e o valor de pH foram idênticos) e usando o mesmo agente de bloqueio (que também pode afetar o desempenho final da enzima). A Tabela 3.1 mostra os resultados. Na etapa de imobilização, a atividade foi maior em pH 7,0 e diminuiu com o aumento do pH (cerca de um terço em pH 9,0). A incubação, mesmo na presença de agentes protetores, diminuiu a atividade em aproximadamente mais 10% para todos os biocatalisadores. O bloqueio dos biocatalisadores com glicina aumentou a atividade dos biocatalisadores, muito provavelmente por induzir alguma alteração conformacional da enzima que foi positiva para atividade com este substrato.

Tabela 3.1. Efeito do pH de imobilização na atividade expressa de PGA imobilizada em VS-agarose. Os biocatalisadores foram imobilizados usando sulfato de sódio 1 M com 50 mM de cada tampão: fosfato de sódio a pH 7,0, fosfato de sódio a pH 8,0 e carbonato de sódio a pH 9,0. A incubação foi realizada em carbonato de sódio 50 mM a pH 9,0 (ácido fenilacético 100 mM e glicerol a 30%) durante 3 h e bloqueio com glicina 2 M a pH 8,0. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito nos Métodos.

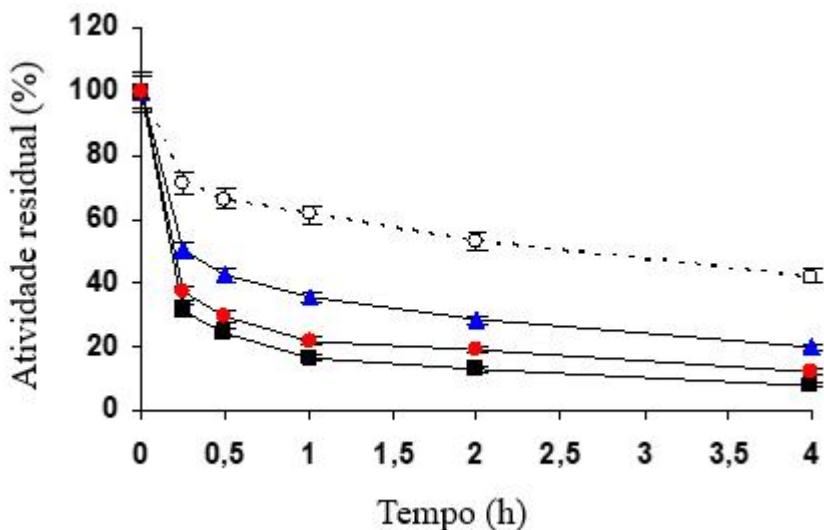
Atividade relativa dos biocatalisadores (%)

pH de imobilização	Imobilização	Incubação	Bloqueio
pH 7	88.60 ± 4.41	70.50 ± 3.87	75.25 ± 3.26
pH 8	77,53 ± 3,87	63.13 ± 3.16	70.32 ± 3.51
pH 9	67.56 ± 3.37	57.02 ± 2.85	66.41 ± 2.82

Fonte: Elaborada pelo autora.

A Figura 3.8 mostra os cursos de inativação dos biocatalisadores. Eles são muito mais estáveis do que a enzima immobilizada em baixa força iônica (Figura 3), mas ainda são significativamente menos estáveis do que o biocatalisador PGA-glioxil, segundo trabalhos anteriores (ALVARO et al., 1990; MATEO et al., 2000a, 2004b). As diferenças entre as estabilidades de todos os biocatalisadores não foram muito grandes, mas a enzima immobilizada em pH 7,0 diminuiu sua atividade de maneira mais lenta, com inativação mais rápida no biocatalisador immobilizado em pH 9,0. Dessa forma, é possível que o pH de immobilização tenha desempenhado um papel importante na definição das características finais da enzima, sendo possivelmente o primeiro evento da immobilização ocasionado por adsorção hidrofóbica. Logo, considerando os parâmetros de atividade/estabilidade, a immobilização em pH 7,0 foi selecionada como a melhor condição para esta primeira etapa.

Figura 3.8. Cursos de inativação térmica de PGA immobilizado em VS-agarose em diferentes valores de pH usando sulfato de sódio 1 mol/L em comparação com a enzima immobilizada em glioxil agarose. Círculos vazios com linha tracejada: glioxilagarose. Triângulos cheios com linha contínua: a immobilização em agarose-VS foi realizada em pH 7,0. Quadrados completos com linha sólida: a immobilização foi realizada em pH 8,0. Círculos completos com linha contínua: a immobilização foi realizada em pH 9,0. Outras especificações são descritas nos Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.3.2. Efeito das Condições de Incubação

(RODRIGUES et al., 2021) relataram que um alto valor de pH do meio reacional (pH 10,05) provocou uma immobilização covalente multipontual intensa entre a enzima penicilina G acilase com o suporte de glioxil, apresentando assim uma maior reatividade entre os nucleófilos da enzima com os grupamentos do suporte. No entanto, as distorções enzimáticas

causadas por esta reação de suporte enzimático podem resultar em uma condição de incubação mais branda que pode produzir melhores parâmetros de atividade/estabilidade. Como descrito no esquema 3.2, a PGA foi imobilizada em pH 7,0 e incubado por 3 horas em pH 7,0, 8,0, 9,0 ou 10,0 na presença de ácido fenilacético e glicerol, e finalmente bloqueado com glicina.

Esquema 3.2. Seqüência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi realizada nos pH's 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. O tempo de incubação de 3 horas e bloqueio com glicina 2 mol/L permaneceram os mesmos para todos os biocatalisadores.



Fonte: Elaborada pelo autora.

A Tabela 3.2 mostra as perdas de atividade de cada etapa. A incubação em pH 10,0 produziu uma diminuição significativa da atividade enzimática, em torno de 40%, enquanto em pH 9,0 a atividade foi superior a 50%, e em pH 7,0 e 8,0, aproximadamente 70%.

Tabela 3.2. Efeito do pH de incubação na atividade expressa de PGA imobilizado em VS-agarose. A enzima foi imobilizada em pH 7,0. A incubação foi realizada em 50 mM de cada tampão (contendo 100 mM de ácido fenilacético e 30% de glicerol); fosfato de sódio a pH 7,0, fosfato de sódio a pH 8,0, carbonato de sódio a pH 9,0 e carbonato de sódio a pH 10,0 durante 3 h. O bloqueio foi realizado por incubação em glicina 2 M a pH 8,0. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito nos Métodos.

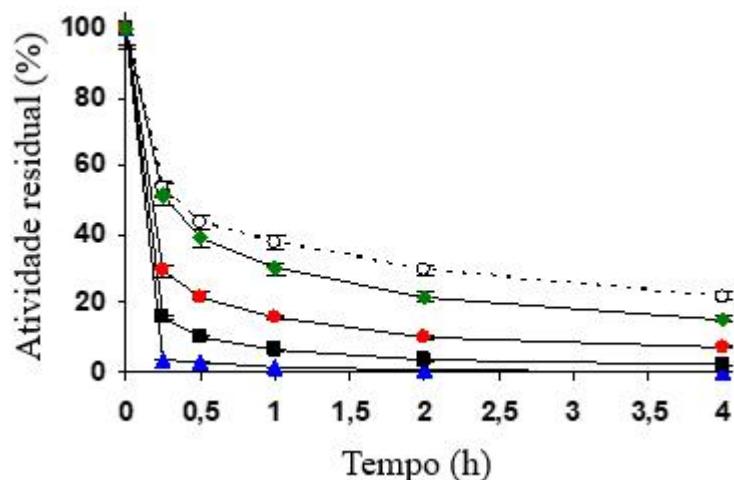
Atividade relativa dos biocatalisadores (%)

pH de Incubação	Imobilização	Incubação	Bloqueio
pH 7	92.46 ± 4.62	69.37 ± 3.46	75.54 ± 3.13
pH 8	85.86 ± 4.29	69.49 ± 3.47	72.66 ± 3.10
pH 9	87.51 ± 4.37	55.36 ± 2.96	61.82 ± 2.59
pH 10	88.57 ± 4.42	35.33 ± 1.76	52.69 ± 1.88

Fonte: Elaborada pelo autora.

O bloqueio produziu um aumento na atividade da enzima que foi mais significativo quando a enzima foi incubada em pH 10. A inativação dos biocatalisadores (Figura 3.9) mostrou que o biocatalisador mais estável foi aquele incubado em pH 10, e foi o próximo em estabilidade após a preparação do glioxil-PGA. As enzimas incubadas em outros valores de pH foram menos estáveis quando o pH de incubação diminuiu. A perda de atividade durante a incubação em pH 10,0 foi parcialmente revertida pela etapa de bloqueio; portanto, selecionou-se o pH 10,0 como o pH de incubação ideal (Tabela 3.3). Em seguida, analisou-se os efeitos do tempo de incubação.

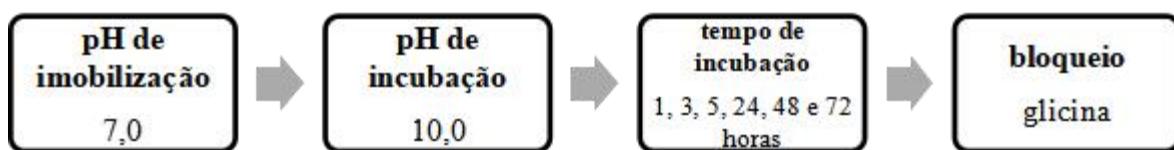
Figura 3.9. Cursos de inativação térmica de PGA imobilizado em pH 7,0 em sulfato de sódio 1 mol/L e incubado em diferentes valores de pH (em comparação com a enzima imobilizada em glioxilagarose. O tempo de incubação foi de 3 h e os biocatalisadores foram bloqueados com glicina 2 mol/L. Vazio círculos com linha tracejada: glioxil agarose-PGA. Triângulos azuis: fosfato de sódio a pH 7,0. Quadrados completos com linha sólida: fosfato de sódio a pH 8,0. Círculos vermelhos: carbonato de sódio a pH 9,0. Losangos verdes: carbonato de sódio em pH 10,0. Outras especificações estão descritas nos Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autora.

O tempo de reação do suporte enzimático é um parâmetro importante na intensidade da ligação covalente multiponto. Tendo em vista esse parâmetro, observa-se no esquema 3.3 os diferentes tempos de incubação nas atividades dos biocatalisadores.

Esquema 3.3. Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi realizada em pH 10,0, observando os efeitos dos tempos de 1, 3, 5, 24, 48 e 72 horas nas atividades dos biocatalisadores. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.



Fonte: Elaborada pela autora.

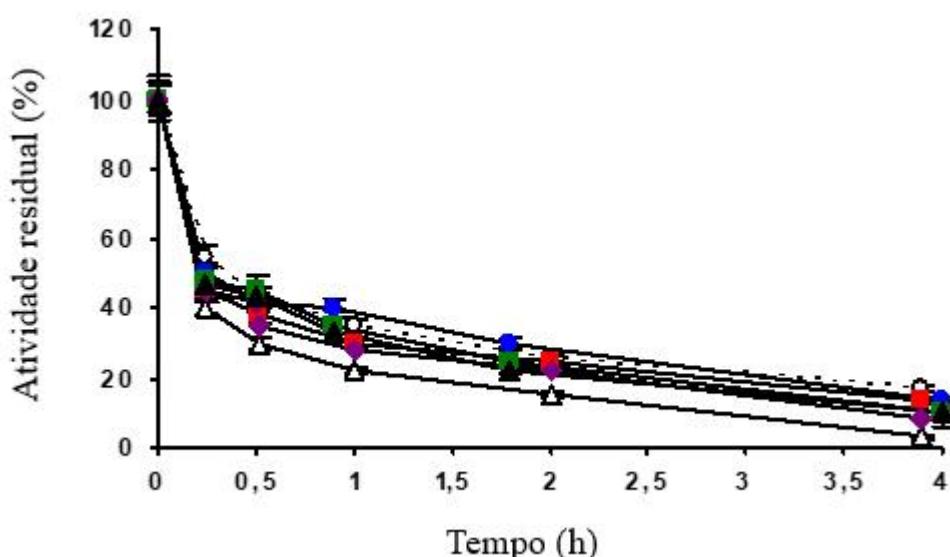
A imobilização pode ser apenas um fenômeno físico (como neste caso) ou envolver apenas uma ligação covalente, sendo que para atingir a intensidade máxima da reação enzima-suporte é necessário deixar tempo suficiente. A imobilização desempenha um papel importante porque envolve a reação entre duas estruturas rígidas e não totalmente complementares (BARBOSA et al., 2013; BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; PEDROCHE et al., 2007; RODRIGUES et al., 2021). A atividade diminuiu de 45% após 1 hora para cerca de 25% após 24 horas, sugerindo uma ligação do tipo covalente entre a enzima e o suporte, permanecendo inalterada posteriormente (Tabela 3.3). A etapa de bloqueio reverteu parcialmente os efeitos negativos do tempo de incubação sobre a atividade e aumentou quase 1,5 para valores que variam de 50%. A taxa de inativação diminuiu ao passar de 1 hora para 3 horas de incubação (Figura 3.10), não havendo redução significativa após esse tempo. Dessa forma, a incubação por 3 horas em pH 10,0 foi selecionada como condição ótima para esta etapa.

Tabela 3.3. Efeito do tempo de incubação na atividade expressa de PGA immobilizado em VS-agarose A immobilização foi em pH 7 e a incubação foi realizada em carbonato de sódio 50 mM (contendo 100 mM de ácido fenilacético e 30% de glicerol) em pH 10,0. O bloqueio foi realizado por incubação em glicina 2 M a pH 8,0. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito nos Métodos.

Atividade relativa dos biocatalisadores (%)			
Tempo de incubação	Imobilização	Incubação	Bloqueio
1 hora	71.96 ± 3.59	40.38 ± 1.52	69.14 ± 3.46
3 horas	90.22 ± 4.51	38.85 ± 1.44	55.08 ± 3.40
5 horas	80.21 ± 4.01	29.55 ± 1.18	50.35 ± 2.76
24 horas	70.67 ± 3.53	26.03 ± 1.30	46.42 ± 2.82
48 horas	83.03 ± 4.15	25.44 ± 1.27	45.95 ± 3.09
72 horas	79.15 ± 3.95	26.62 ± 1.33	45.90 ± 3.35

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3.10. Cursos de inativação térmica da PGA immobilizada em pH 7 em sulfato de sódio 1 M e incubada a pH 10,0 por tempos diferentes, em comparação com a enzima immobilizada em glixilagarose. O biocatalisador foi bloqueado com glicina 2 M. Círculos vazios com linha tracejada: glixilagarose. Triângulos vazios com linha sólida: 1 h. Círculos em azul com linha sólida: 3 h. Quadrados em vermelho com linha contínua: 5 h. Quadrados verdes com linha sólida: 24 h. Losango lilás: 48 h. Triângulos completos com linha contínua: 72 h. Outras especificações são descritas nos Métodos.

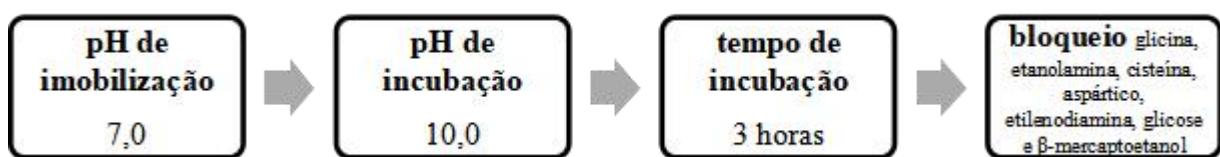


Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.3.3. Efeito da Etapa de Bloqueio

Esta etapa altera as interações físicas enzima-suporte (SOUZA et al., 2021). O esquema 3.4 está relacionado aos biocatalisadores imobilizados em pH 7,0 tendo como efeito de incubação o tempo de 3 horas em pH 10,0.

Esquema 3.4. Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi realizada por 3 horas em pH 10,0, tendo como estudo diferentes agentes de bloqueio.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 3.4 mostra que o bloqueio com glicina e etanolamina produziu as preparações mais ativas (aumentando a atividade em quase 1,5 vezes) e produzindo uma atividade final em torno de 55%.

Tabela 3.4. Efeito do agente bloqueador na atividade expressa de PGA imobilizado em VS-agarose. A enzima foi imobilizada em sulfato de sódio 1 M/fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, incubada em carbonato de sódio 50 mM (ácido fenilacético 100 mM e glicerol 30%) a pH 10,0 por 3 h. A concentração dos agentes bloqueadores foi de 2 M em pH 8,0 por 48 h. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito nos Métodos.

Atividade relativa dos biocatalisadores (%)			
Agente de bloqueio	Immobilização	Incubação	Bloqueio
Glicina	74,79 ± 3,74	40,37 ± 0,72	55,75 ± 1,93
Etanolamina	75,62 ± 3,78	39,67 ± 0,78	57,24 ± 2,86
Cisteína	82,44 ± 4,12	38,95 ± 0,74	30,03 ± 1,50
Aspártico	74,32 ± 3,72	40,31 ± 0,76	3,40 ± 0,17
Etilenodiamina	76,67 ± 3,83	40,25 ± 0,71	40,05 ± 2,01
Glicose	78,91 ± 3,95	41,66 ± 0,78	44,87 ± 2,24
β-mercaptopropano	73,49 ± 3,67	38,02 ± 0,70	9,42 ± 0,47

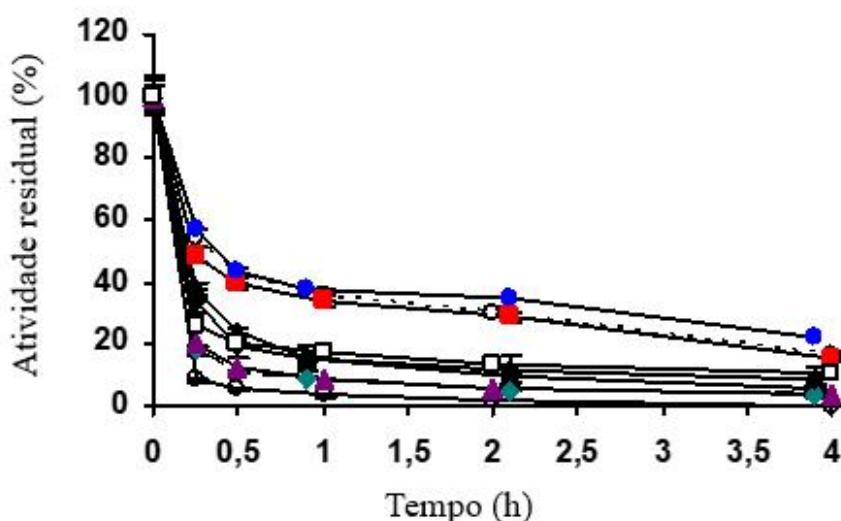
Fonte

Elaborada pelo autora.

O bloqueio com β -mercaptoetanol e aspártico produziu uma diminuição significativa na atividade do biocatalisador incubado (a atividade final foi de 9% e 3%, respectivamente), enquanto que com cisteína reduziu a atividade para 30%. Glicose ou etilenodiamina não afetaram significativamente a atividade enzimática.

A comparação da estabilidade de diferentes biocatalisadores (Figura 3.11) mostrou que o biocatalisador não bloqueado não era o menos estável, indicando que um agente bloqueador inadequado pode ser negativo para a estabilidade da enzima. O uso de etanolamina ou glicina como agentes bloqueadores produziu estabilidade semelhante à da PGA-glioxil (relatado como sendo milhares de vezes mais estável que a enzima livre) (ALVARO et al., 1990; MATEO et al., 2000a, 2002a). O bloqueio com glicose e etilenodiamina produziu biocatalisadores ligeiramente menos estáveis do que o biocatalisador não bloqueado, enquanto o bloqueio com cisteína e β -mercaptoetanol resultou em estabilidades semelhantes ao biocatalisador não bloqueado. O bloqueio com aspártico produziu um biocatalisador com a estabilidade mais baixa. Portanto, o bloqueio foi considerado decisivo para a estabilidade final do biocatalisador (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015b, 2015c, 2015d; SANTOS et al., 2015b; SOUZA et al., 2021; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018), e neste caso a etanolamina e a glicina produziram os melhores resultados.

Figura 3.11. Efeito de diferentes agentes bloqueadores na estabilidade da enzima penicilina G acilase imobilizada em alta força iônica em vinil sulfona agarose. A imobilização foi realizada em fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e a incubação a pH 10,0. Círculos vazios com linha tracejada: glioxilagarose como referência. Círculo azul: etanolamina. Quadrados vermelhos: glicina. Quadrados vazios com linha sólida: β -mercaptoetanol. Losango completo com linha sólida: cisteína. Triângulo cheio com linha sólida: controle sem agente bloqueador como referência. Triângulos lilás: glicose. Losangos azul claro: etilenodiamina. Círculos vazios com linha sólida: ácido aspártico. Outras especificações são descritas nos Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Conclusões

A imobilização direta de PGA em VS-agarose produziu baixo rendimento de imobilização, atividade expressa e estabilização da enzima. No entanto, VS-agarose tem um caráter hidrofóbico moderado, tornando este suporte em um heterofuncional de fato. O uso de alta força iônica permitiu uma rápida imobilização de PGA em VS-agarose, iniciada pela adsorção hidrofóbica da enzima no suporte, logo seguida por ligações covalentes que impediram a dessorção da enzima. Isso converteu a VS-agarose em um suporte heterofuncional, com as vantagens e desvantagens que isso pode ter. O estudo individual das etapas de imobilização, incubação e bloqueio produziu biocatalisadores de PGA com estabilidades semelhantes às da glioxil-PGA agarose, considerado um dos biocatalisadores mais estáveis dessa enzima. O caráter moderadamente hidrofóbico do VS pode ser uma característica interessante na imobilização de enzimas e proteínas que imobilizam lentamente no VS de forma direta, abrindo novas aplicações para este suporte na imobilização de enzimas. Além disso, os resultados mostram que a imobilização de enzimas em VS pode seguir um protocolo complexo que direciona a reação entre grupos químicos na enzima e no VS do suporte, já que a enzima imobiliza facilmente em suportes glioxil, mas não em suportes VS.

Capítulo 4

*Sinergia de Troca Iônica e
Reação
covalente: Imobilização de
Penicilina G Acilase em
Amino-Vinil Sulfona
Agarose Heterofuncional*

4.1 Resumo

Os grânulos de agarose-vinilsulfona (VS) apresentam perfil adequado para imobilizar várias enzimas, embora esse processo seja mais delicado quando relacionado a algumas enzimas. É o caso da penicilina G acilase (PGA) de *Escherichia coli*, que é imobilizada muito lentamente neste suporte (menos de 10% em 24 h). Esta enzima também não é significativamente adsorvida em grânulos aminados de MANAE-agarose, considerado um trocador aniónico. Para este estudo, grânulos de MANAE-agarose foram modificados com divinilsulfona (DVS) para produzir grânulos de MANAE-vinilsulfona (VS) agarose. Quando a PGA foi imobilizada neste suporte, a enzima foi totalmente imobilizada em menos de 1,5 horas. A PGA não pode ser liberada do suporte por incubação em alta força iônica, sugerindo assim que a enzima foi rapidamente imobilizada de forma covalente. Considerando que, de acordo a análise elementar realizada, a quantidade de grupos VS reativos não aumentou significativamente, os resultados indicaram algum efeito cooperativo entre a troca aniónica nos grupos amina do suporte, provavelmente como a primeira etapa do processo, e a ligação covalente das moléculas de PGA previamente adsorvidas. A reação covalente das moléculas de enzima previamente adsorvidas ocorre de forma muito mais eficiente do que a da enzima livre, devido à proximidade dos grupos reativos do suporte e da enzima. Finalmente, as etapas de imobilização, incubação e bloqueio com diferentes agentes foram estudadas para determinar os efeitos na atividade/estabilidade final. A estabilidade da PGA imobilizada neste novo catalisador foi melhorada, em relação ao biocatalisador preparado a partir de VS-agarose sob baixa força iônica.

Palavras-chave: Trocador de íons; Suportes heterofuncionais; Sinergia na imobilização de enzimas; Imobilização de enzimas covalentes; penicilina G acilase.

4.2 Introdução

A enzima penicilina G acilase (PGA) de *Escherichia coli* é um dos exemplos mais bem sucedidos de biocatálise industrial (COBOS-PUC et al., 2020; LI et al., 2020; MAREŠOVÁ et al., 2014; PAN et al., 2022; SRIRANGAN et al., 2013). Essa enzima tem sido usada há décadas na produção do ácido 6-aminopenicilânico por hidrólise da penicilina G, uma etapa fundamental na produção de antibióticos β -lactâmicos semissintéticos (GRIGORENKO et al., 2014; VALENCIA et al., 2011). Têm-se observado a penicilina G acilase na utilização dessa na etapa de amidação na produção desse drogas por meio de estratégias controladas termodinamicamente ou cineticamente (FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1991; GIORDANO; RIBEIRO; GIORDANO, 2006; HARRIS et al., 2022; PAN et al., 2020; VOLPATO; C. RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; YE et al., 2019). Além disso, a enzima tem sido utilizada na resolução de misturas racêmicas (BALDARO et al., 1993; BASSO et al., 2000; CARDILLO; TOLOMELLI; TOMASINI, 1996; FADNAVIS; SHARFUDDIN; VADIVEL, 1999) e etapas de desbloqueio em processos sintéticos (WALDMANN; HEUSER; REIDEL, 1994; WALDMANN; HEUSER; SCHULZE, 1996), etc. Devido a isso, o interesse da indústria por essa enzima é bastante alto.

Para o uso industrial de PGA, uma forma imobilizada é preferida para facilitar sua recuperação e reutilização (KALLENBERG; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2005). Além disso, embora a estabilidade da enzima nas condições hidrolíticas seja razoável até mesmo para ser utilizada na indústria, para alguns outros usos (por exemplo, para síntese controlada termodinamicamente na presença de altas concentrações de co-solventes orgânicos), a estabilidade da enzima deve ser muito aumentada, e sua imobilização tem se mostrado uma ferramenta potente neste sentido (ABIAN et al., 2001, 2002, 2003; ESTRUCH et al., 2008; FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1999; FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1991; MONTES et al., 2007b). A estabilidade das enzimas pode ser aumentada usando um protocolo de imobilização adequado, por diferentes razões (por exemplo, prevenção de interações intramoleculares, ligação covalente multiponto, geração de ambientes hidrofílicos, etc) (RODRIGUES et al., 2021). Neste contexto, a PGA tem sido usada como uma das enzimas modelo inicial em muitas estratégias de imobilização-estabilização de enzimas: glixil, epóxido, CLEAs, etc., e no acoplamento de ferramentas genéticas para imobilização, captura de biocatalisadores moles, etc. (ALVARO et al., 1990; BOLIVAR et al., 2009; BRAHAM et al., 2021c; CAO et al., 2001; CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000;

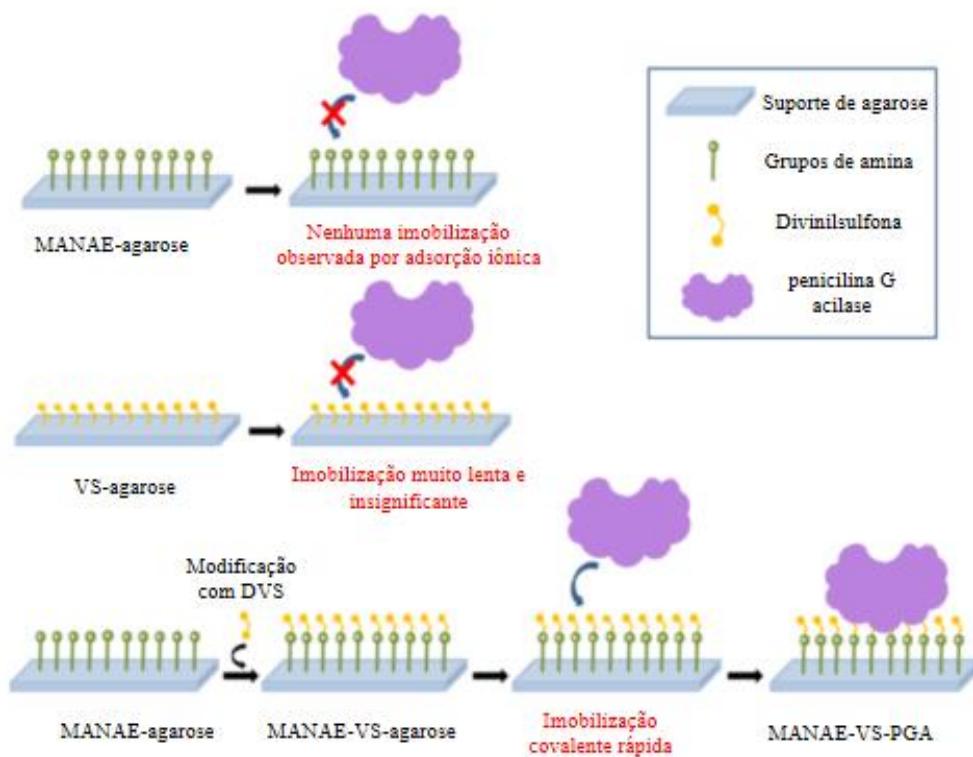
GRAZU et al., 2006; GRAZÚ et al., 2010a; GRAZU; LÓPEZ-GALLEGOS; GUÍSÁN, 2012; GUÍSÁN, 1988; KALLENBERG; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2005; LUO et al., 2015; MATEO et al., 2000a, 2000b, 2002a; MONTES et al., 2006, 2007a, 2007b; MORELLON-STERLING et al., 2021a; SERRA et al., 2009; WILSON et al., 2004, 2006b).

Suportes ativados por reação com divinilsulfona (DVS) foram descritos há muito tempo como uma matriz muito útil para imobilizar biomacromoléculas (BALE OENICK et al., 1990; BRYJAK; LIESIENE; KOLARZ, 2008; CHENG et al., 2019; LABUS et al., 2011; LI et al., 2019; MORALES-SANFRUTOS et al., 2010; ORTEGA-MUÑOZ et al., 2010; SHANG et al., 2012). Recentemente, eles provaram ser capazes de imobilizar as enzimas por meio de uma intensa ligação covalente multiponto, se o protocolo de imobilização for adequadamente projetado (DOS SANTOS et al., 2015a, 2015d; MORELLON-STERLING; BOLIVAR; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; PINHEIRO et al., 2019). Os suportes de vinilsulfona (VS) podem reagir com as frações de amino, tiol, imidazol, fenol e tiol primários de enzimas, mas o braço espaçador é relativamente longo (5 átomos mais o braço no suporte), e isso significa que cada ligação covalente introduz uma rigidez menor do que o uso de outros suportes, como suportes ativados por gioxila (DOS SANTOS et al., 2015a). O protocolo de imobilização com suportes ativados por VS deve incluir três etapas diferentes, que devem ser estudadas de forma independente. A primeira etapa é a imobilização da enzima, que determina a área da enzima que interage com o suporte. A segunda é a incubação da enzima imobilizada, onde o pesquisador tenta maximizar a reação enzima-suporte, sem diminuir em excesso a atividade da enzima. A última etapa é o bloqueio dos grupos VS restantes (DOS SANTOS et al., 2015a). Deixar os restantes grupos vinil sulfona no suporte sem bloqueio significa que podem ocorrer reações covalentes descontroladas entre a enzima e o suporte durante a operação e que o suporte pode reagir (e desta forma, pode ser bloqueado descontroladamente) através de componentes do meio de reação. Esta etapa é fundamental para determinar não só a estabilidade da enzima, mas também a atividade e especificidade (as interações enzima-suporte podem alterar a estrutura da enzima) e até mesmo a via de inativação da enzima, tornando-se um dos pontos centrais na otimização do protocolo de imobilização utilizando estes suportes. (ALBUQUERQUE et al., 2016; SANTOS et al., 2015b; SOUZA et al., 2021). Embora isso represente uma etapa adicional, também abre novas oportunidades no desenho dos biocatalisadores, como a possibilidade de imobilizar no suporte enzimas via adsorção física, co-imobilizando essas enzimas com outras ligadas covalentemente que deveriam ser previamente imobilizadas, podendo ser reutilizados após a inativação das

enzimas fisicamente immobilizadas após sua liberação e immobilização de novos lotes de enzimas (ARANA-PEÑA et al., 2022c; MORELLON-STERLING et al., 2021b).

Neste artigo, propõe-se o uso de um suporte heterofuncional (esferas de agarose de aminovinil sulfona) para immobilização da PGA, de acordo com o evidenciado no Esquema 4.1. Este suporte já foi utilizado para immobilizar outras enzimas, algumas delas dificilmente immobilizadas em VS-agarose monofuncional (MALLIN; HÖHNE; BORNSCHEUER, 2014; PINHEIRO et al., 2019; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018).

Esquema 4.1. Estratégia de immobilização de PGA em grânulos de agarose MANAE, VS-agarose e agarose MANAE-vinilsulfona (VS) heterofuncional.



Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com o que foi proposto segundo o esquema anterior, a hipótese é que ocorrerá, no preparo do suporte de MANAE-VS-agarose, a troca iônica da molécula da enzima no suporte, e que a proximidade entre os grupos VS reativos no suporte e os grupos reativos na enzima permitirá a rápida immobilização covalente da enzima. Este suporte foi preparado por modificação de um suporte previamente modificado com etilenodiamina, o que significa que o braço espaçador, já relativamente longo neste suporte, como dito acima, tem quatro átomos

a mais. Isso significa que a rigidez introduzida na estrutura da enzima com cada ligação enzima-suporte adicional deve ser menor do que a obtida usando um suporte VS-agarose padrão, embora seja possível que a enzima possa ser imobilizada no suporte por mais pontos (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; RODRIGUES et al., 2021).

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Material

A enzima penicilina G acilase (PGA) foi adquirida da Merck (Madrid, Espanha), na forma de solução aquosa (com valor médio de 86 ± 4 mg de proteína por mL). O kit Protein Assay Dye Reagent foi adquirido da Bio-Rad (Alcobendas, Espanha). Ácido fenilacético, ácido 6-nitro-3-(fenilacetamido)benzóico (NIPAB), etilenodiamina (EDA), glicina, etanolamina, cisteína, glicose, aspártico e β -mercaptoetanol foram adquiridos da Merck. Borohidreto de sódio e periodato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Divinilsulfona (DVS) foi fornecido pela Thermo Fisher Scientific (Madrid, Espanha). Sepharose® 4BCL foi adquirido da ABT (Madrid, Espanha). Glioxil (MATEO et al., 2005) e MANAE-grânulos de agarose, segundo metodologia proposta por (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993). Todos os outros reagentes eram de grau analítico. As análises elementares foram realizadas pelo CAI da Microanálisis Elemental, Universidade Complutense de Madrid, utilizando um microanalisador de combustão Leco 932 CHNS (EA Consumables, Marlton, NY, EUA).

4.3.2 Métodos

4.3.2.1. Determinação da atividade hidrolítica de PGA

Um espectrofotômetro com controle de temperatura a 40 °C e agitação magnética (200 rpm) foi utilizado para determinar a atividade da enzima. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de substrato por minuto e por massa de biocatalisadores (proteína ou biocatalisador) nas condições do ensaio. O ácido 4-etil-3-nitro-benzóico (NIPAB) foi utilizado na determinação da atividade enzimática da PGA, conforme descrito por Kutzbach e Rauenbusch (KUTZBACH; RAUENBUSCH, 1974). O substrato foi preparado em fosfato de sódio 50 mM a pH 7,5 na concentração de 0,15 mM. Em seguida, 100–200 μ L de suspensão de enzima

ou solução de enzima solúvel foram adicionados ao meio de reação para inicializar a reação. A atividade foi medida seguindo o aumento da absorbância a 405 nm causado pela hidrólise do NIPAB (ϵ nessas condições é $8730\text{ M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$).

4.3.2.2 Preparação de Esferas de Agarose-MANAE-VS

Para o preparo das esferas de agarose-MANAE-VS, inicialmente 15 mL de divinilsulfona foram adicionados a 200 mL de carbonato de sódio 333 mM a pH 11,5 sob agitação até obter uma solução homogênea (ARANA-PEÑA et al., 2020e). Em seguida, 10 g de suporte de agarose-MANAE foram adicionados sob agitação suave por 2 horas. Após esse período, o suporte ativado foi filtrado a vácuo com um funil de vidro sinterizado, lavado extensivamente com água destilada e armazenado a 4–6 °C.

4.3.2.3. Imobilização de PGA em Esferas de Agarose-MANAE-VS

Em todos os experimentos, a PGA foi imobilizada com carga de 2,5 mg/g de suporte. Uma suspensão de referência foi preparada usando grânulos de agarose inertes. A imobilização foi monitorada medindo a atividade de PGA presente na suspensão, sobrenadante e suspensão de referência. A atividade no sobrenadante dividida pela atividade na suspensão de referência forneceu o rendimento da imobilização, ou seja, a porcentagem de enzima que foi imobilizada. Foi fornecido em todos os casos o rendimento de imobilização (porcentagem de enzima imobilizada no suporte) e atividade expressa (atividade observada dividida pela esperada do rendimento de imobilização) (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Os ensaios de imobilização foram realizados na proporção de 1 g de suporte para 10 mL de solução enzimática. A PGA foi diluída em solução de fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 e pH 8,0, ou solução de carbonato de sódio 5 mM a pH 9,0 (a concentração de proteína foi de 0,25 mg/mL). Para verificar a imobilização covalente, a enzima imobilizada foi incubada em 1 M de sulfato de sódio. Após a imobilização da enzima, os biocatalisadores foram filtrados e lavados com o tampão utilizado na etapa de incubação (25 mM de fosfato de sódio em pH 7,0 ou 8,0, ou 25 mM de carbonato de sódio em pH 9,0 ou 10,0), e os biocatalisadores foram ressuspensos sob estas condições por tempos diferentes para permitir a ligação covalente multiponto, adicionando 30% de glicerol (v/v) e 100 mM de ácido fenil acético para prevenir a inativação da enzima (ABIAN et al., 2002; FERNÁNDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1991). Após os tempos desejados, e para finalizar a reação enzima-

suporte, os biocatalisadores foram lavados com água destilada e ressuspensos em soluções 2 M de diferentes nucleófilos (EDA, glicina, etanolamina, cisteína, aspártico ou β -mercaptoetanol) em 100 mM de fosfato de sódio em pH 8,0 por 48 horas para bloquear os grupos VS restantes no suporte. Amostras foram retiradas para verificar a atividade enzimática durante todo o processo.

4.3.2.4 Inativação Térmica de Diferentes Biocatalisadores

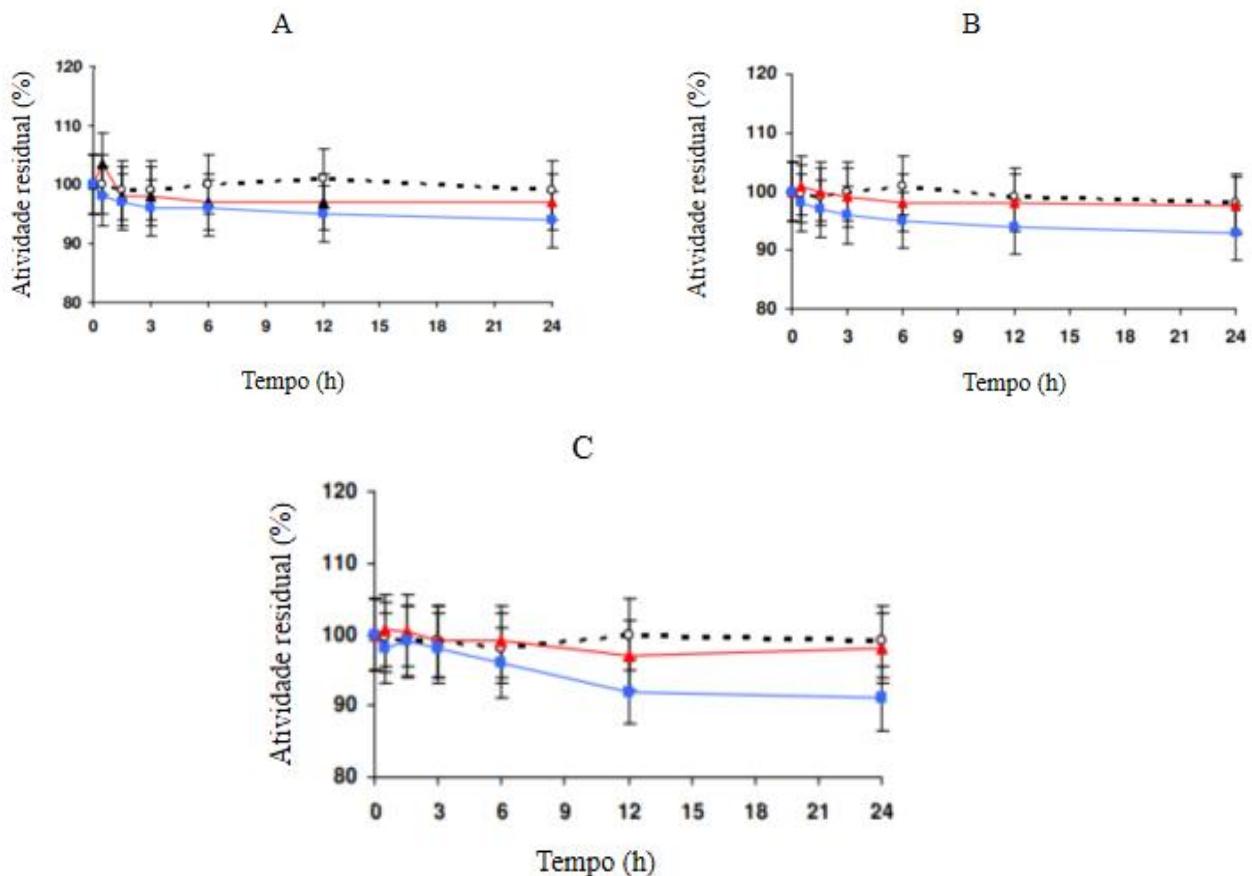
As estabilidades térmicas dos diferentes biocatalisadores foram avaliadas, através da incubação desses em 50 mM de Tris-Cl a pH 8,0 em banho-maria com temperatura de 55 °C. Periodicamente, as amostras foram coletadas e suas atividades residuais foram determinadas usando o ensaio NIPAB descrito acima, considerando a atividade inicial da preparação como 100% e referenciando a atividade das outras amostras a esse valor inicial como uma porcentagem.

4.4. Resultados

4.4.1. Imobilização de PGA em Agarose-VS e em Agarose-MANAE

A Figura 4.1 mostra que menos de 10% da enzima é imobilizada em agarose-VS após 24 horas, mesmo em pH 9,0. Isso ocorreu mesmo com a enzima imobilizada rapidamente em glioxilagarose (ABIAN et al., 2004; ALVARO et al., 1990; BRAHAM et al., 2021c; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; MORELLON-STERLING et al., 2021a; TEMPORINI et al., 2010), suporte que requer o estabelecimento de várias ligações aminoenzima-suporte aldeído para imobilizar a enzima (MATEO et al., 2005), participando apenas na reação dos grupos amino primários não ionizados da enzima.

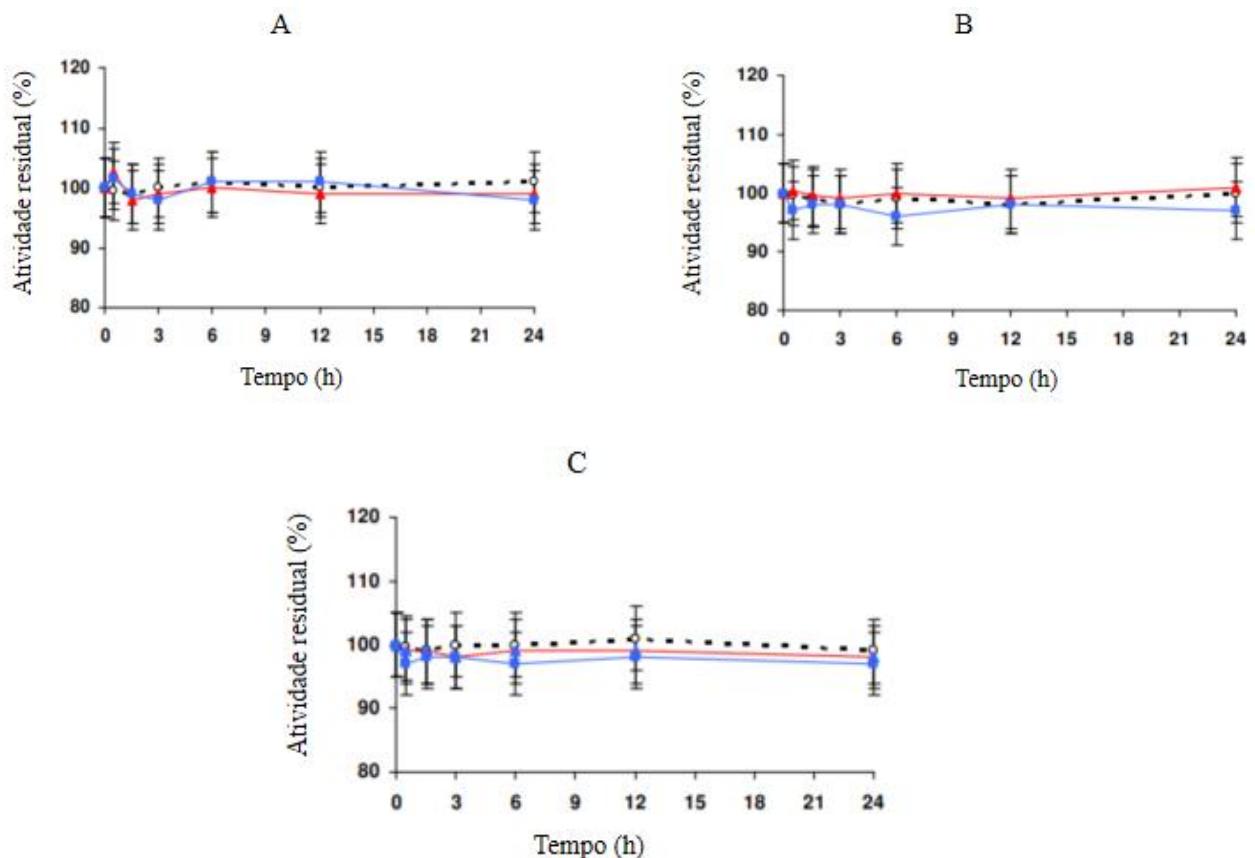
Figura 4.1. Efeito do pH nos cursos de imobilização de PGA em agarose-VS a 25 °C usando 5 mM do tampão correspondente. Os dados são apresentados como atividade residual em %, considerando 100% da atividade inicial. (A) Acetato de sódio a pH 5,0, (B) fosfato de sódio a pH 7,0 e (C) carbonato de sódio a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos vermelhos: suspensão. Quadrados azuis: sobrenadante. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autora.

A Figura 4.2 mostra que a PGA não foi imobilizada em agarose-MANAE em nenhum dos valores de pH testados (5,0, 7,0 e 9,0). A enzima PGA apresenta algumas subpopulações de proteínas com ponto isoelétrico variando entre 6,2 e 6,8 (KUTZBACH; RAUENBUSCH, 1974). Ou seja, embora em pH 5,0 essa falta de troca iônica enzima-suporte seja esperada, em pH 7,0 e principalmente em pH 9,0, a enzima deve ficar imobilizada no suporte catiônico. Essa falta de adsorção do PGA nas trocas iônicas fracas pode estar relacionada ao grande número de pontes iônicas que os grupos iônicos da enzima exibem em sua superfície, dificultando seu envolvimento na troca iônica do PGA (FUENTES et al., 2007). Dessa forma, parece que esses suportes individuais foram ineficientes para imobilizar o PGA.

Figura 4.2. Efeito do pH nos cursos de imobilização de PGA (2,5 mg/g) em esferas de agarose-MANAE a 25 °C em 5 mM do tampão correspondente. Os dados são apresentados como atividade residual em %, considerando 100% da atividade inicial. (A) Acetato de sódio a pH 5,0, (B) fosfato de sódio a pH 7,0 e (C) carbonato de sódio a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência. Triângulos vermelhos: suspensão. Quadrados azuis: sobrenadante. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Preparação de Esferas de Agarose-MANAE-VS

As esferas de agarose-MANAE-VS foram preparadas conforme descrito na Seção de Métodos. As análises elementares dos diferentes suportes (agarose, agarose-VS, agarose-MANAE e agarose-MANAE-VS) são apresentadas na Tabela 4.1 . Os suportes foram novamente submetidos a uma reação com etilenodiamina (EDA) para verificar se os grupos VS eram reativos.

Tabela 4.1. Quantidades de nitrogênio e enxofre presentes nos diferentes suportes à base de grânulos de agarose 4% BCL após sua funcionalização com etilenodiamina (EDA) ou divinil sulfona. Os dados foram obtidos por meio de análise elementar, conforme descrito na seção Métodos.

Suporte	Modificação do suporte	
	µmol N/g Suporte seco	µmol S/g Suporte seco
Agarose	0	0
Agarose-VS	0	2340 ± 90
Agarose-VS-EDA	1640 ± 80	2230 ± 110
Agarose-MANAE	2360 ± 90	0
Agarose-MANAE-VS	2150 ± 110	2760 ± 110
Agarose-MANAE-VS-EDA	3210 ± 230	2370 ± 140

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como constatado na Tabela 4.1, a agarose não apresentou quantidades detectáveis de S ou N. A ativação do suporte com DVS produziu uma modificação do suporte que tinha mais de 2320 micromoles de S por g de suporte seco. No entanto, a modificação deste suporte com EDA produziu uma relação de N/S de apenas 0,72, que esperávamos atingir o valor 2 se todos os grupos VS fossem reativos e todos fossem modificados. O uso de um tempo de reação mais longo (acima de 48 horas) na reação EDA/VS-suportes não produziu mudanças significativas nessa proporção, sugerindo que o problema era que provavelmente refere-se a inativação de alguns grupos VS (ou ligados por polimerização em grupos VS previamente imobilizados), ou algumas moléculas de EDA podem reagir com 2 VS no suporte. Agarose-MANAE apresentou 2360 µmols de N (ou seja, 1180 mols de grupos EDA). A quantidade de VS introduzido em agarose-MANAE foi de 2760, sugerindo que VS também pode reagir com grupos amino secundários; isto é, 2-3 moléculas de VS podem ser introduzidas pela molécula EDA no suporte. No entanto, a reatividade desses grupos VS foi reduzida, pois a razão N/S passou apenas de 0,78 para 1,36, e apenas cerca de 25 a 30% dos grupos VS reagiram com EDA livre. Juntamente com a possibilidade de ter muitos VS inativados, a reação cruzada de uma única molécula de EDA com dois grupos VS não pode ser descartada, e isso pode ser mais provável aqui do que no suporte padrão devido à proximidade dos grupos VS que reagem com o mesmo grupo EDA.

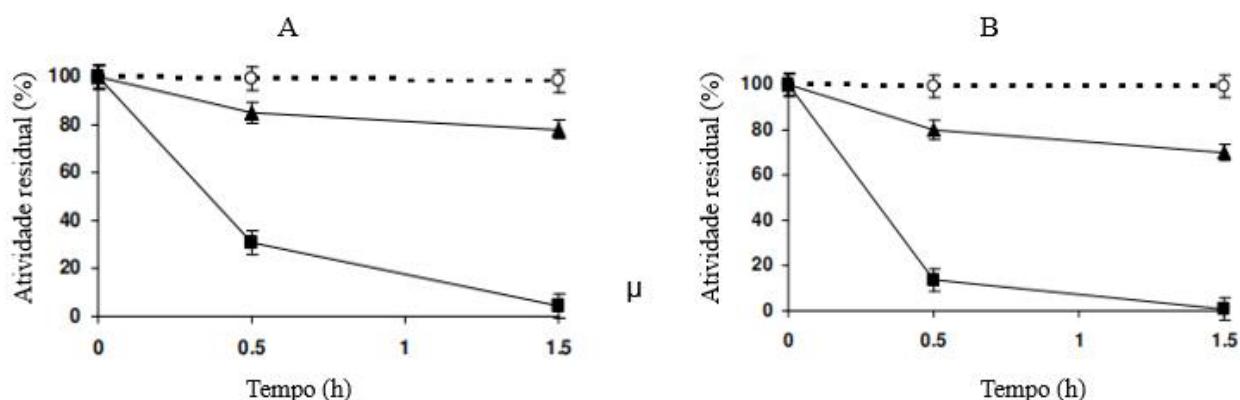
De qualquer forma, parece que o aumento de grupos VS usando o novo suporte não pode ser decisivo para determinar a imobilização da enzima, e que a reatividade química do suporte é apenas ligeiramente menor nos suportes monofuncionais do que nos suportes

heterofuncionais. (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015d; MORELLON-STERLING; BOLIVAR; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; PINHEIRO et al., 2019; SANTOS et al., 2015b; SOUZA et al., 2021).

4.4.3 Imobilização de PGA em grânulos de Agarose-MANAE-VS

A Figura 4.3 mostra que a PGA foi totalmente imobilizada em grânulos de agarose-MANAE-VS em apenas 1,5 h em pH 7,0 e 9,0. Quando tentou-se liberar a enzima do suporte incubando a enzima em 1 M de sulfato de sódio, nenhuma enzima pôde ser liberada do suporte desde a primeira etapa da imobilização em ambas as condições. Isso contrasta com os resultados mostrados na Figura 4.1 e na Figura 4.2, sugerindo assim que pode ser possível ter uma pequena fração de moléculas de PGA que são adsorvidas por troca iônica no suporte, que posteriormente reagem muito rapidamente de forma covalente com os grupos vinilsulfona, promovendo o deslocamento do equilíbrio de troca iônica e levando assim à imobilização covalente da enzima completa. Resultados semelhantes foram relatados na imobilização de enzimas com alto ponto isoelétrico em suportes de aminoglutaraldeído (AIT BRAHAM et al., 2019). A enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* que não apresentou resultados significativos na imobilização em suportes VS monofuncionais prontamente imobilizou, em força iônica moderada, em um suporte heterofuncional de aminovinilsulfona. (ALBUQUERQUE et al., 2016; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018).

Figura 4.3. Efeito do valor do pH nos cursos de imobilização de PGA em agarose-MANAE-VS a 25 °C em 5 mM do tampão indicado. Os dados são apresentados como atividade residual em %, considerando 100% da atividade inicial. (A) Fosfato de sódio a pH 7,0 e (B) carbonato de sódio a pH 9,0. Círculos vazios com linha tracejada: suspensão de referência (0,25 mg/mL). Triângulos completos com linha sólida: suspensão. Quadrados completos com linha contínua: sobrenadante. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

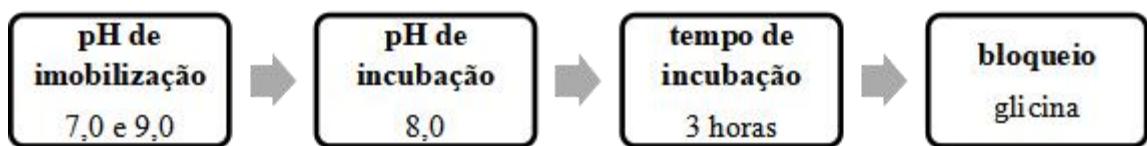
A imobilização foi mais rápida em pH 9,0 do que em pH 7,0, e isso pode ser devido a uma reação covalente mais rápida (maior em valores de pH alcalino) ou a uma troca iônica mais eficiente (considerando o ponto isoelétrico moderadamente alto da enzima). A enzima imobilizada em pH 7,0 reteve cerca de 80% da atividade após a imobilização, enquanto a enzima imobilizada em pH 9,0 reteve cerca de 70% (Figura 3). Esta maior perda na atividade enzimática em pH 9,0 pode estar relacionada à maior reatividade enzima-suporte neste valor de pH (DOS SANTOS et al., 2015a). Posteriormente foi realizado o estudo das diferentes etapas envolvidas na imobilização da enzima em suportes VS.

4.4.4. Estudo dos Parâmetros Definidores dos Parâmetros Funcionais da Agarose-MANAE-VS-PGA

4.4.4.1. Efeito do pH de imobilização

Inicialmente foi realizado o estudo do efeito do pH na imobilização. Esse primeiro parâmetro pode determinar a região da superfície da enzima que está envolvida na imobilização, e isso pode determinar não só a atividade da enzima, mas também a estabilidade da enzima imobilizada (GRAZÚ et al., 2010a; GRAZU; LÓPEZ-GALLEGO; GUISÁN, 2012; MANSFELD et al., 1999; MANSFELD; ULRICH-HOFMANN, 2000; ULRICH-HOFMANN; ARNOLD; MANSFELD, 1999). O esquema 4.2 menciona as etapas relacionadas as diferentes variáveis utilizadas na construção do biocatalisador. No primeiro momento, fixou-se um tempo de incubação de 3 horas em pH 8,0 utilizando glicina como agente de bloqueio, contudo avaliando os pH's 7,0 e 9,0 para essa primeira etapa.

Esquema 4.2. Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi estudada mediante os pH's 7,0 e 9,0. A incubação foi realizada em pH 8,0 por 3 horas. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.



Fonte: Elaborada pela autora.

A evolução da atividade do biocatalisador PGA é mostrada na Tabela 4.2. A imobilização produziu uma diferença na atividade expressa de apenas 10% (80% quando

imobilizado em pH 7,0 ou 70% se imobilizado em pH 9,0). A incubação promoveu uma redução significativa na atividade da enzima para cerca de 30%, mas como em outros casos (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015c, 2015d, 2015e; SANTOS et al., 2015b; SOUZA et al., 2021, 2022; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018), a atividade foi parcialmente recuperada durante a etapa de bloqueio, proporcionando atividade de cerca de 50% para ambos os biocatalisadores.

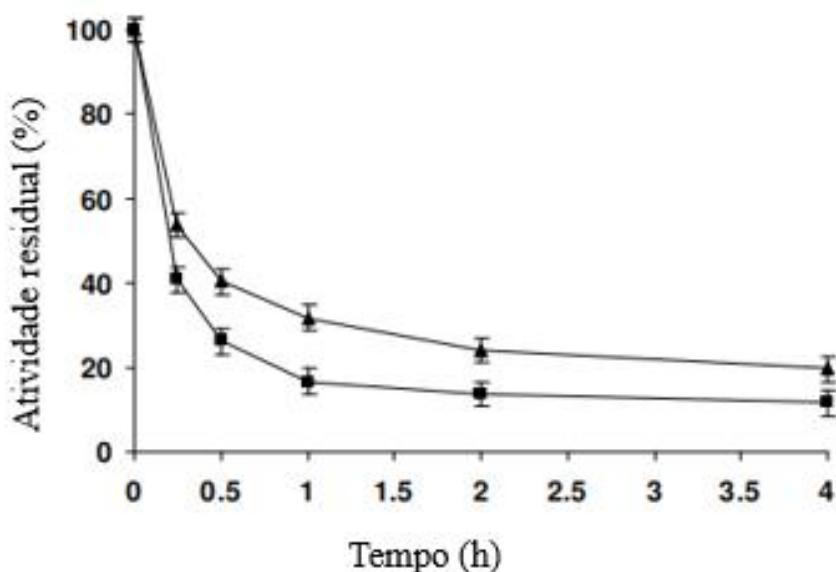
Desta forma, foi feito o estudo de acordo com as estabilidades térmicas das enzimas imobilizadas usando ambos os valores de pH de imobilização. Na inativação das enzimas (Figura 4.4), a enzima imobilizada em pH 7,0 foi mais estável do que a enzima imobilizada em pH 9,0. Deve-se considerar que a enzima imobilizada em pH 9,0 tem certa vantagem na reação enzima-suporte, possivelmente a uma maior reatividade dos nucleófilos presents na enzima em pH alcalino, e deve produzir uma ligação covalente multiponto mais intensa (DOS SANTOS et al., 2015a). No entanto, ao constatar os dados de estabilidade para essa primeria etapa vê-se que a área da enzima imobilizada em contato com o suporte quando imobilizada em pH 7,0 foi mais importante para a estabilidade da enzima do que a área da enzima em contato com o suporte quando a enzima foi imobilizada em pH 9,0 permitiu atingindo assim, uma maior imobilização covalente multiponto (GRAZÚ et al., 2010a; GRAZU; LÓPEZ-GALLEGO; GUISÁN, 2012; MANSFELD et al., 1999; MANSFELD; ULBRICH-HOFMANN, 2000; ULBRICH-HOFMANN; ARNOLD; MANSFELD, 1999). Outra explicação provável é que a imobilização em pH 9,0 causou algumas mudanças conformacionais na estrutura da enzima, produzindo uma estrutura menos estável, mesmo que posteriormente mais ligações enzima-suporte pudessem ser alcançadas.

Tabela 4.2. Efeito do pH de imobilização na atividade relativa de diferentes biocatalisadores de PGA nas diferentes etapas do processo de imobilização. Os biocatalisadores foram imobilizados em fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 ou carbonato de sódio a pH 9,0. A incubação foi realizada em carbonato de sódio 25 mM a pH 8,0 (100 mM de ácido fenilacético e 30 % de glicerol) por 3 h e o bloqueio foi feito utilizando glicina 2 M a pH 8,0. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito na Seção de Métodos.

Atividade relativa dos biocatalisadores (%)			
pH de imobilização	Imobilização	Incubação	Bloqueio
pH 7		$77,5 \pm 3,9$	$35,7 \pm 0,5$
pH 9		$70,8 \pm 3,5$	$47,1 \pm 2,4$

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.4. Cursos de inativação térmica de PGA imobilizado em agarose-MANAE-VS usando diferentes valores de pH de imobilização. Triângulos inteiros: imobilização em fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0. Quadrados completos: imobilização em carbonato de sódio 5 mM a pH 9,0. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir desses resultados, os experimentos prosseguiram a partir da imobilização da enzima em pH 7,0.

4.4.4.2. Efeito do pH de incubação

Neste estudo, a enzima foi imobilizada em pH 7,0, incubada por 3 horas em pH 7,0, 8,0,

9,0 e 10,0 e bloqueada com glicina, como pode ser verificado no esquema 4.3.

Esquema 4.3. Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0. A incubação foi analisada mediante pH's 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 por 3 horas. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.



Fonte: Elaborada pela autora.

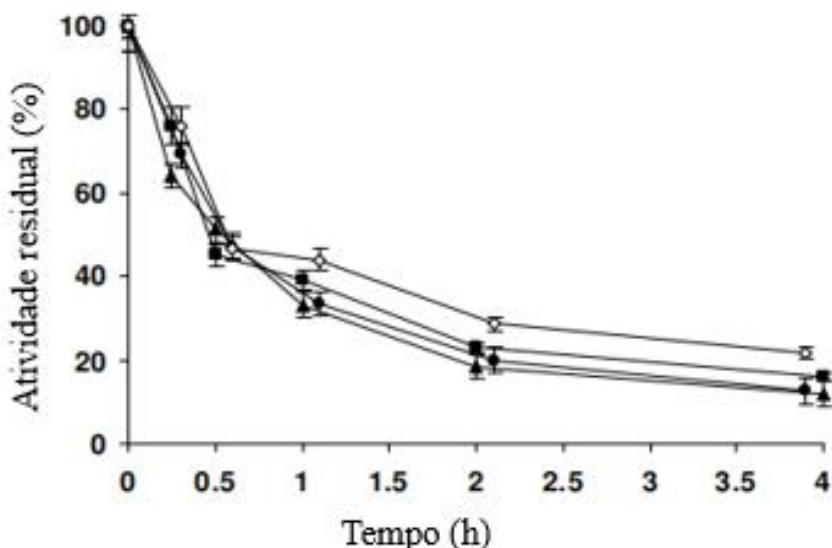
A Tabela 4.3 mostra os resultados da atividade relativa versus ácido 6-nitro-3-(fenilacetamido)benzóico (NIPAB). Pode-se observar que a etapa de incubação produziu uma diminuição semelhante na atividade enzimática (de cerca de 80% para apenas 30-35%) em todos os valores de pH de incubação, e o bloqueio com glicina, como na seção acima, permitiu a recuperação da atividade para cerca de 50-55%. As diferenças não foram relevantes neste parâmetro e, desta forma, analisou-se a estabilidade das diferentes preparações. Os cursos de inativação relatados na Figura 4.5 mostram que a incubação em pH 10,0 proporcionou uma leve melhora na estabilidade da enzima em relação à incubação nos demais valores de pH. Nesse pH, a reatividade dos grupos lisina na enzima deve ser maior do que nos outros valores de pH.

Tabela 4.3. Efeito do pH de incubação na atividade hidrolítica relativa do PGA. A imobilização foi realizada em fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0. A incubação foi realizada com fosfato de sódio 25 mM em pH 7,0 e 8,0 ou carbonato de sódio em pH 9,0 e 10,0 (sempre foram adicionados 100 mM de ácido fenilacético e lycerol a 30%) por 3 h. O bloqueio foi feito com 2 M de glicina em pH 8,0 por 48 h. Outros detalhes podem ser encontrados na seção Métodos.

Atividade relativa dos biocatalisadores (%)			
pH de incubação	Imobilização	Incubação	Bloqueio
pH 7	80,3 ± 3,9	34,1 ± 0,5	51,4 ± 2,6
pH 8	78,6 ± 3,7	31,6 ± 0,6	52,6 ± 2,6
pH 9	79,6 ± 3,8	32,7 ± 0,5	53,4 ± 2,6
pH 10	78,4 ± 3,8	30,1 ± 0,6	53,3 ± 2,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.5. Efeito do pH de incubação do biocatalisador PGA em sua estabilidade térmica. A figura mostra os cursos de inativação térmica de PGA imobilizado em pH 7 e incubado em diferentes valores de pH. Triângulos inteiros: pH 7,0. Círculos completos: pH 8,0. Quadrados completos: pH 9,0. Losangos vazios: pH 10,0. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.



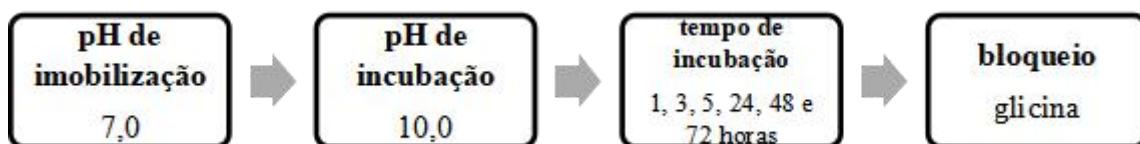
Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa forma, foi utilizada a imobilização em pH 7,0 e a incubação em pH 10,0 nos estudos posteriores.

4.4.4.3. Efeito do tempo de incubação

O tempo de incubação é uma variável muito importante para definir a atividade final e a estabilidade da enzima, pois após a etapa de imobilização enzimática, ocorrerá a reação entre o suporte e as superfícies da enzima (que se tornará mais rígida após cada ligação adicional enzima-suporte) (PEDROCHE et al., 2007). Com isso, verifica-se no esquema 4.4, a sequência relacionada a essa etapa do processo de imobilização.

Esquema 4.4. Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em pH 7,0, incubação em pH 10, tendo como estudo os tempos de 1, 3, 5, 24, 48 e 72 horas. O bloqueio permaneceu com glicina 2 mol/L.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 4.4 mostra como quando o tempo de incubação foi prolongado por 3 horas, houve uma diminuição relativamente rápida da atividade da enzima. Após esse período, a diminuição da atividade ocorreu de forma mais lenta.

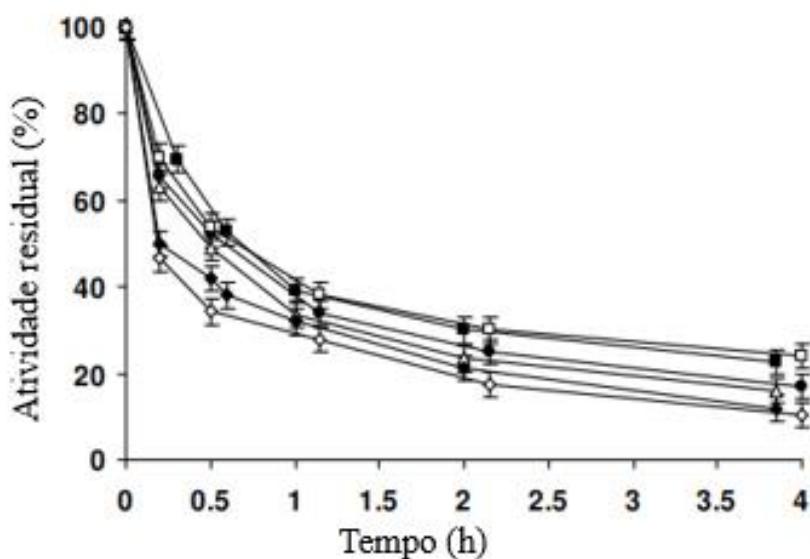
O bloqueio com glicina permitiu a recuperação da atividade em todos os casos, com a atividade variando entre 51% e quase 55%. A atividade relativa não pareceu um ponto decisivo para selecionar o biocatalisador PGA. No entanto, ao observer o curso de inativação referente à Figura 4.6 vê-se que a estabilidade aumentou progressivamente até 5 horas de incubação. Após esse tempo não houve mais melhorias na estabilidade da enzima, sendo os biocatalisadores preparados por incubação de 48 ou 72 horas os que apresentam curvas relacionadas às menores estabilidades. Possivelmente essa ocorrência deve-se à promoção da conformação distorcida da enzima que introduz alguma tensão na estrutura da enzima, promovendo uma enzima com menor estabilidade.

Tabela 4.4. Efeito do tempo de incubação na atividade hidrolítica relativa (considerando 100% da atividade da enzima oferecida para a imobilização) dos biocatalisadores PGA imobilizados em fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 e incubados em carbonato de sódio 25 mM (100 mM de ácido fenilacético e 30% de glicerol) a pH 10,0. O bloqueio foi feito com glicina. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito na Seção de Métodos.

Atividade relativa dos biocatalisadores (%)			
Tempo de incubação	Imobilização	Incubação	Bloqueio
1 hora	$81,28 \pm 3,7$	$50,1 \pm 0,8$	$53,8 \pm 2,7$
3 horas	$79,2 \pm 3,8$	$40,2 \pm 0,8$	$52,9 \pm 2,6$
5 horas	$76,3 \pm 3,7$	$31,1 \pm 0,9$	$51,1 \pm 2,6$
24 horas	$81,5 \pm 3,7$	$28,4 \pm 0,7$	$51,4 \pm 2,6$
48 horas	$80,6 \pm 3,7$	$30,0 \pm 0,7$	$51,2 \pm 2,6$
72 horas	$81,2 \pm 3,8$	$27,7 \pm 0,7$	$50,80 \pm 2,5$

Fonte: Elaborada pelo autora.

Figura 4.6. Efeito do tempo de incubação na estabilidade dos biocatalisadores de PGA imobilizados em pH 7 e incubados em pH 10,0 durante diferentes tempos. Triângulos vazios com linha sólida: 1 h. Círculos completos com linha sólida: 3 h. Quadrados completos com linha contínua: 5 h. Quadrados vazios com linha sólida: 24 h. Losango completo com linha sólida: 48 h. Losango vazio com linha contínua: 72 h. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.



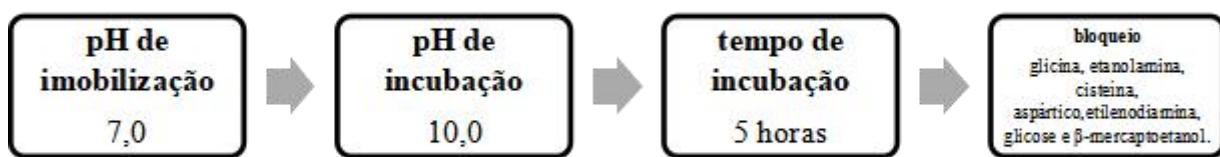
Fonte: Elaborado pela autora.

Após a constatação desses resultados, a incubação foi definida em pH 10,0 por 5 horas para a próxima etapa.

4.4.4.4 Efeito do Agente de Bloqueio

Como foi comentado anteriormente, muitos estudos apontam que a etapa de bloqueio pode ter uma influência significativa na preparação de uma enzima imobilizada por vinilsulfona (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015a, 2015c, 2015d, 2015e; SANTOS et al., 2015b; SOUZA et al., 2021, 2022; ZAAK; SASSI; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2018). Assim, para elaboração dessa última etapa, foi investigado o efeito de diferentes agentes de bloqueio nas características da PGA imobilizada, conforme destacado no esquema 4.5.

Esquema 4.5. Sequência relacionada aos efeitos das variáveis reacionais como influentes na construção do biocatalisador. A imobilização foi realizada em 7,0. A incubação foi realizada em pH 10,0 por 5 horas. O bloqueio foi realizado com glicina, etanolamina, cisteína, aspártico, etilenodiamina, glicose e β - mercaptoetanol, 2 mol/L.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 4.5 mostra que o bloqueio com mercaptoetanol produziu uma diminuição ainda maior da atividade da enzima, sendo que a atividade final do biocatalisador expressou menos de 5% da inicial. Entre os outros agentes bloqueadores, glicina é o influente que permitiu manter a maior atividade (acima de 50%), enquanto que o uso do aspártico e da cisteína renderam uma atividade final de 35% (aumentando ligeiramente a atividade após a etapa de incubação). O uso de etanolamina e etilenodiamina permitiu recuperar mais de 40% da atividade utilizada no processo de imobilização. Ao estudar a estabilidade da enzima, vê-se na Figura 4.7 que o bloqueio com glicina e mercaptoetanol forneceram as maiores estabilidades (embora a atividade do mercaptoetanol tenha sido, inicialmente, 10 vezes menor (Tabela 4.5)). O bloqueio com EDA, mesmo grupo apresentado no suporte abaixo dos grupos VS, produziu o biocatalisador com menor estabilidade. A etanolamina foi o segundo

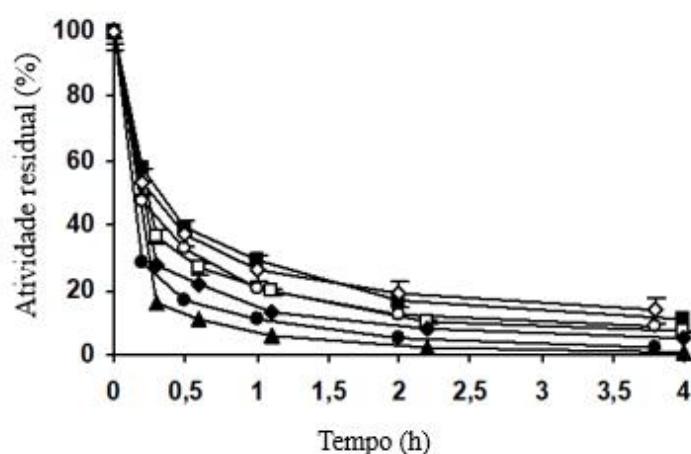
biocatalisador menos estável, sugerindo que um suporte catiônico não foi muito adequado para a estabilidade da enzima. Usando suporte VS monofuncional e alta força iônica, este agente bloqueador produziu o biocatalisador mais estável (DA ROCHA et al., 2022b), apontando para as grandes diferenças entre ambos os biocatalisadores, e para a necessidade de estudar empiricamente cada protocolo de imobilização enzimática.

Tabela 4.5. Efeito do agente bloqueador (2 M) na atividade hidrolítica relativa (considerando 100% da atividade inicial utilizada na imobilização) dos biocatalisadores PGA imobilizados em pH 7 e incubados por 5 h em pH 10,0. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito na Seção de Métodos.

Atividade relativa dos biocatalisadores (%)			
Agente de bloqueio	Imobilização	Incubação	Bloqueio
Glicina	$76,2 \pm 3,8$	$33,2 \pm 1,0$	$51,00 \pm 2,6$
Etanolamina	$77,3 \pm 3,9$	$31,6 \pm 0,9$	$42,2 \pm 2,1$
Cisteína	$77,3 \pm 4,1$	$30,4 \pm 0,8$	$36,1 \pm 1,8$
Aspártico	$76,9 \pm 3,9$	$31,4 \pm 0,8$	$35,3 \pm 1,8$
Etilenodiamina	$76,5 \pm 3,8$	$34,6 \pm 0,9$	$41,8 \pm 2,1$
Glicose	$76,6 \pm 3,7$	$32,3 \pm 0,8$	$36,34 \pm 1,8$
β-mercaptoetanol	$77,2 \pm 3,9$	$31,5 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,2$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.7. Efeito do agente bloqueador nos cursos de inativação térmica dos biocatalisadores de PGA imobilizados em pH 7 e incubados em pH 10,0 por 5 h. Quadrados completos: glicina. Quadrados vazios: cisteína. Triângulos inteiros: etilenodiamina. Círculos vazios: ácido aspártico. Círculos completos: glicose. Losango completo: etanolamina. Losangos vazios: β -mercaptoetanol. Outras especificações são descritas na Seção de Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autora.

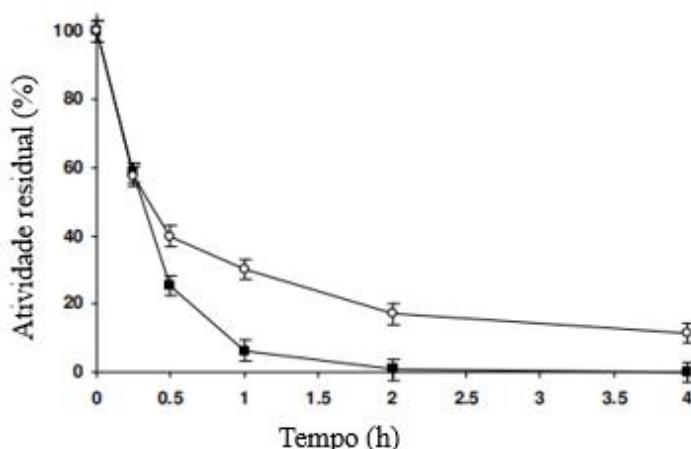
O bloqueio com cisteína e ácido aspártico produziu estabilidades semelhantes, embora inferiores às obtidas pelo bloqueio com glicina (usando VS monofuncional em alta força iônica, o ácido aspártico produziu o biocatalisador menos estável) (DA ROCHA et al., 2022b).

Os diferentes efeitos dos reagentes de bloqueio podem ser consequência de vários fatores. Primeiro, em todos os casos, havia uma camada de um composto dicatônico abaixo da camada de VS que não havia no caso anterior. Em segundo lugar, é possível que a área da enzima em contato com o suporte não seja a mesma em ambos os casos.

Entre os reagentes estudados, considerando os resultados referentes à atividade relativa e a estabilidade, a glicina foi o agente de bloqueio mais adequado na produção do biocatalisador.

A Figura 4.8 mostra a comparação das estabilidades da PGA livre e da PGA imobilizada mais estável (com glicina) preparada neste trabalho. A enzima imobilizada mostrou-se mais estável que a enzima livre (por exemplo, mantendo 30% da atividade inicial após 1 hora, enquanto a enzima livre manteve apenas 5%). Embora esta estabilização seja relevante, ela não se compara bem com a estabilização obtida usando suportes glioxil (ALVARO et al., 1990; MORELLON-STERLING et al., 2021a) ou epóxido (MATEO et al., 2000a, 2002b), ou mesmo VS monofuncional (DA ROCHA et al., 2022b). A razão pode ser devido ao efeito negativo da superfície catiônica abaixo da enzima (efeito encontrado usando VS monofuncional após bloqueio com EDA) (DA ROCHA et al., 2022b) e/ou o braço espaçador mais longo usado neste artigo (RODRIGUES et al., 2021).

Figura 4.8. Cursos de inativação térmica de PGA solúvel em 50 mM de Tris HCl (quadrados sólidos) e Agarose-MANAE-VS-PGA imobilizado em pH 7, incubado por 5 h em pH 10 e bloqueado com glicina (círculos vazios). Outros detalhes podem ser encontrados na Seção de Materiais.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Conclusões

A principal conclusão deste trabalho é que a cooperação entre duas causas diferentes de imobilização, individualmente incapazes de produzir a imobilização da enzima, produziu uma aceleração da imobilização de PGA em suportes de agarose-MANAE-VS. Isso ocorreu mesmo que a imobilização não fosse apreciada usando suportes de agarose-MANAE e fosse lenta usando esferas monofuncionais de agarose-VS. A reação covalente ocorreu de forma rápida após a adsorção da enzima que não foi possível liberar as enzimas dos biocatalisadores, mesmo nos primeiros momentos, comprovando a rápida reação entre a enzima adsorvida e os grupos VS. As etapas de imobilização, incubação e bloqueio desempenham papéis importantes no desempenho final do biocatalisador e devem ser estudadas de maneira específica. Os reagentes de bloqueio apresentam diferentes efeitos qualitativos usando suportes VS monofuncionais ou o amino-VS bifuncional, confirmando a importância desta etapa nas propriedades finais da enzima imobilizada. No caso específico da enzima utilizada para este trabalho, o biocatalisador final apresentou uma estabilização menor do que usando outros métodos de imobilização, possivelmente devido aos braços espaçadores mais longos ou à presença próxima de grupos catiônicos, embora seja interessante seu estudo como modelo para esse tipo de situação.

Capítulo 5

A determinação da estabilidade da lipase imobilizada depende do substrato e da condição de determinação da atividade: inativações de estresse e temperatura ótima como indicadores de estabilidade de biocatalisadores

5.1 Resumo

As lipases A e B de *Candida antarctica* (CALA e CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Candida rugosa* foram imobilizadas em octil, octil-vinil sulfona (bloqueada com etilenodiamina) e amino-glutaraldeído. Os biocatalisadores exibiram especificidade diferente versus triacetina e *p*-nitrofenilbutirato. As atividades ótimas foram determinadas usando triacetina para todos os biocatalisadores, e isso variou de 40 °C para CALA e TLL, a 60 °C para um amino-glutaraldeído-CRL. Os biocatalisadores foram inativados a 70 e 75 °C, determinando suas atividades residuais a 25 °C ou 55 °C. Os cursos de inativação foram muito diferentes dependendo do substrato; na maioria dos casos, os biocatalisadores mantiveram mais atividade durante a inativação térmica usando triacetina (exceto usando TLL). Ao determinar as atividades residuais a 55 °C, os valores aumentaram na maioria dos casos, atingindo altos valores de hiperativação usando CALA (até 23 vezes). Dessa forma, a “estabilidade” das diferentes preparações foi fortemente influenciada pelas condições de determinação do substrato e da atividade residual, e não coincidiu na maioria dos casos com as temperaturas ótimas.

Palavras-chave: Estabilidade; Temperatura ótima; Especificidade da lipase.

5.2 Introdução

Um dos pontos onde mais ênfase é dada na preparação de um biocatalisador enzimático é na estabilidade da enzima (ILLANES, 1999; KADISCH et al., 2017; POLIZZI et al., 2007). Isso marca a possibilidade de reutilização da enzima e a gama de condições em que a enzima pode ser usada e, portanto, a produtividade do biocatalisador (MEISSNER; WOODLEY, 2022).

Ao estudar as características da enzima, alguns artigos incluem apenas o perfil enzima/atividade. A atividade enzimática geralmente aumenta exponencialmente com o aumento da temperatura em faixas de temperatura moderadas, mas esse aumento diminui quando se aproxima da temperatura ideal (a temperatura onde a atividade máxima é observada nas condições definidas) e depois diminui quando a temperatura é definida acima das temperaturas ideais (DANIEL; DANSON, 2010; DILL; GHOSH; SCHMIT, 2011; GILLOOLY et al., 2001; SCHNELL; TURNER, 2004). As reduções de atividade são geralmente atribuídas a alterações na enzima, que podem ser consequência da desnaturação enzimática, alteração da sensibilidade à temperatura do substrato-enzima ou alterações nos estágios de transição enzima-produto (GLOWACKI; HARVEY; MULHOLLAND, 2012), alterações na capacidade térmica da enzima intermediários ligados (GÜRDAŞ; GÜLEÇ; MUTLU, 2012; KEKENES-HUSKEY; SCOTT; ATALAY, 2016; YADAV; PRAKASH, 2009), variações no estado iônico no centro ativo da enzima (DANIEL; DANSON, 2010) ou vários deles atuando simultaneamente (DELONG et al., 2017) .

Muitos trabalhos tendem a relatar a estabilidade operacional da enzima nessas condições “ótimas” de atividade, que são aquelas em que a enzima está perto de começar a ficar distorcida no tempo de determinação do ensaio de atividade, consequentemente, geralmente eles mostram uma estabilidade operacional da enzima relativamente pobre, como todos os cursos de reação levarão muito mais tempo do que o ensaio de determinação de atividade. Deve ser preferível usar temperaturas de atividade abaixo do ideal para ter uma estabilidade operacional da enzima muito melhor (GRUBECKI, 2016). Além disso, a temperatura ótima da enzima não é um parâmetro objetivo, pois depende das condições experimentais e pode mudar de um laboratório para outro apenas por mudanças nas mesmas. Espera-se que o valor exato do pH no ensaio possa alterar os resultados, mas isso é simples de ser mantido em valores semelhantes de um laboratório para outro. No entanto, as concentrações de enzimas usadas na determinação da atividade também podem ser críticas

para definir a temperatura ideal, bem como sua pureza. Por exemplo, enzimas multiméricas podem tender a se dissociar durante as condições de ensaio mais drásticas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009) , e se isso ocorrer, a concentração da enzima pode determinar a estabilidade da enzima e, assim, observar as temperaturas ótimas da enzima. As lipases tendem a formar agregados lipase-lipase envolvendo duas formas abertas das lipases, dando formas com atividade e estabilidade diferentes, e isso depende das condições do meio (por exemplo, força iônica, presença de detergentes ou grandes biomacromoléculas hidrofóbicas ou temperatura) (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2003; PALOMO et al., 2003; WILSON et al., 2006a). Os substratos/produtos podem ter efeitos positivos/negativos na estabilidade da enzima (por exemplo, usando peróxido de hidrogênio, fenóis (GRUBECKI, 2018a, 2018b, 2021; HERNANDEZ et al., 2012; MATEO et al., 2000b)), e dessa forma, suas concentrações durante o ensaio de atividade enzimática também podem alterar os resultados. Alguns tampões ou sais têm efeitos negativos ou positivos na estabilidade da enzima, mesmo em uma forma diferente para diferentes preparações enzimáticas (BRAHAM et al., 2021b, 2021c; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2015, 2016b; ZAAK et al., 2017a) e isso também pode alterar a temperatura “ótima” final da enzima. Também pode ser esperado que a temperatura ótima calculada de uma enzima dependa da duração do ensaio de atividade. À primeira vista, quanto mais tempo a enzima é exposta a altas temperaturas, mais tempo o calor pode induzir alterações indesejadas na estrutura da enzima. Dessa forma, temperaturas de ensaio mais longas podem produzir uma temperatura “ideal” mais baixa observada. Nesse sentido, só se pode esperar que a temperatura ótima seja semelhante de um laboratório para outro se as condições e os protocolos de medição forem totalmente idênticos. Dessa forma, a caracterização da estabilidade de enzimas imobilizadas pode não ser uma tarefa simples, pois elas podem ser afetadas por diversos fatores, incluindo a imobilização e os protocolos de determinação de atividade (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; ILLANES et al., 1998; ILLANES; WILSON, 2003, 2020).

A complexidade do entendimento da estabilidade de preparações enzimáticas imobilizadas também pode estar relacionada à diversidade de causas subjacentes para conduzir à inativação da enzima (estrutural, efeitos de partição, microambiente, acesso ao substrato) (BOLIVAR; EISL; NIDETZKY, 2016; BOMMARIUS; PAYE, 2013). Alguns outros artigos incluem apenas inativações de estresse, normalmente coletando amostras sob condições de inativação de estresse e analisando as atividades residuais em condições brandas. Dessa forma, é provável que uma enzima parcialmente distorcida possa recuperar

parte da atividade perdida pela inativação térmica durante o ensaio de determinação de atividade (RODRIGUES et al., 2009b; RUEDA et al., 2015a; SOLER et al., 1997; SUESCUN et al., 2015), e a atividade residual final medida pode depender do tempo do ensaio e da concentração do substrato. No entanto, tanto as inativações de estresse quanto as temperaturas ótimas são consideradas boas estimativas da estabilidade da enzima e, embora um tanto imperfeitas, espera-se que estejam correlacionadas; uma enzima que exiba uma temperatura ótima mais alta será considerada uma enzima mais estável e vice-versa.

Uma das estratégias para aumentar a estabilidade da enzima é a imobilização da enzima (BOMMARIUS; PAYE, 2013; DICOSIMO et al., 2013; GARCIA-GALAN et al., 2011; IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; KLIBANOV, 1979; LIESE; HILTERHAUS, 2013; MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2021; SHELDON; VAN PEEL, 2013) . Inicialmente projetada para permitir a recuperação e reutilização da enzima, hoje em dia espera-se que a imobilização melhore muitas propriedades funcionais (seletividade, atividade, especificidade, pureza, resistência a inibidores), sendo a estabilização da enzima um dos principais alvos (GARCIA-GALAN et al., 2011; IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; KLIBANOV, 1979; MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2021) . Recentemente, as causas da estabilização da enzima após a imobilização (envolvendo rigidez da estrutura da enzima, geração de microambientes, prevenção da dissociação da subunidade, etc) foram revisadas (RODRIGUES et al., 2021).

Durante a seleção do protocolo de imobilização para aumentar a estabilidade da enzima, os pesquisadores tendem a selecionar um dos métodos acima, esperando que eles possam estar de alguma forma correlacionados com o outro (como em muitos casos estão) (SIAR et al., 2019, 2018a, 2018b). Isso mesmo considerando que a situação usando enzimas imobilizadas pode ser mais complexa do que usando enzima livre. Em situações na qual a difusão do substrato pode diminuir a atividade da enzima (BENÍTEZ-MATEOS et al., 2020; BORTONE; FIDALEO; MORESI, 2014; SCHMIEG; NGUYEN; FRANZREB, 2020; VAN DAELE et al., 2016; XIU; JIANG; LI, 2001), foi descrito que a formação do produto responde duas vezes mais fortemente ao aumento da temperatura do que a difusão ou transporte (RITCHIE, 2018).

Assim, neste artigo apresentou-se as características de estabilidade de várias das lipases mais utilizadas (lipases de *Candida antarctica* (formas A e B, CALA e CALB) (ANDERSON; LARSSON; KIRK, 1998; BŁASZCZYK; KIEŁBASIŃSKI, 2020;

DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005a; GOTOR-FERNÁNDEZ; BUSTO; GOTOR, 2006; MONTEIRO et al., 2021), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) e *Candida rugosa* (CRL) (BENJAMIN; PANDEY, 1998; DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006) imobilizado seguindo diferentes protocolos em grânulos de agarose (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016b). Como explicado acima, o uso de lipases livres pode produzir muitos artefatos em estudos de estabilidade, por isso focamos nossa atenção na comparação dos diferentes biocatalisadores de lipase imobilizada.

A imobilização em grânulos de octil-agarose foi um dos métodos de imobilização selecionados. Baseia-se na ativação interfacial de lipases (BRZOZOWSKI et al., 1991b; GROCHULSKI et al., 1993; MARTINELLE; HOLMQUIST; HULT, 1995; VERGER, 1997a) na superfície hidrofóbica do suporte, dando como resultado uma forma monomérica de lipase com estrutura aberta estabilizada (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019). Outro método de imobilização foi o uso de vinilsulfona-octil-agarose heterofuncional (ALBUQUERQUE et al., 2016). Este protocolo de imobilização da lipase começa com a ativação interfacial da enzima na camada octil, mas posteriormente, algumas ligações covalentes são estabelecidas entre a enzima e o suporte (ARANA-PEÑA et al., 2022b). A etapa de bloqueio introduz novos grupos na superfície do suporte, a enzima passa a ficar exposta a interações com o agente bloqueador e os grupos octil, podendo alterar o desempenho da enzima e até mesmo sua via de inativação (SOUZA et al., 2021). Finalmente, as enzimas foram imobilizadas covalentemente em esferas de agarose aminadas ativadas por glutaraldeído. Espera-se que esse método de imobilização imobilize a enzima via troca iônica, seguida da ligação covalente da enzima (BARBOSA et al., 2014). Em seguida, foi analisada a estabilidade dos biocatalisadores, usando dois substratos diferentes e duas temperaturas (25 °C e 55 °C, onde a decomposição química do substrato começa a ser muito alta para uma determinação confiável da atividade), e a temperatura onde a atividade máxima obtida para cada biocatalisador também foi determinada. A utilização de uma temperatura acima da temperatura ótima da maioria dos biocatalisadores na determinação da atividade residual deve reduzir a reativação da enzima durante a determinação da atividade residual.

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Materiais

Para este estudo, utilizamos diferentes formulações líquidas comerciais de lipase: Lipozyme B, (CALB, 7,7 mg de proteína por mL), NovoCor® ADL (CALA, 7,68 mg de proteína por mL), TLL (20,77 mg de proteína lipase por mL). Eles foram gentilmente cedidos

pela Novozymes (Madrid, Espanha). CRL em formulação em pó (3,2% de teor de proteína), glutaraldeído (25% (v/v)), etilenodiamina (EDA), *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) e triacetina foi adquirido da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha). A divinilsulfona (DVS) foi adquirida da Thermo Fisher Scientific Spain (Madrid, Espanha). Os grânulos Octil-Sepharose® CL-4B foram adquiridos da GE Healthcare. O método de Bradford foi empregado para determinar a concentração de proteínas usando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976b). Foram empregados produtos de grau analítico de outros solventes e reagentes.

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Preparação de gel de octil-vinilsulfona agarose

O suporte de agarose octilvinilsulfona foi preparado seguindo o protocolo desenvolvido por (ALBUQUERQUE et al., 2016) com pequenas modificações. 10 g de octil-agarose foram adicionados a 200 mL de uma solução formada por tampão carbonato de sódio 0,333 M e 0,35 M de divinilsulfona em pH 11,5. Esta suspensão foi colocada sob leve agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Finalmente, o suporte ativado foi filtrado a vácuo, lavado extensivamente com água destilada e armazenado a 4-6 °C.

5.3.2.2 Preparação do suporte de glutaraldeído-agarose

Após preparo da agarose aminada (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993), o suporte foi ativado com glutaraldeído por incubação em solução de glutaraldeído a 10% em pH 7,0 por 16 h. Isso permitiu introduzir duas moléculas de glutaraldeído por grupo amino no suporte (BARBOSA et al., 2014; BETANCOR et al., 2006b; MONSAN, 1978). Após, os suportes ativados foram lavados com água destilada para retirada do excesso de glutaraldeído e armazenados em geladeira.

5.3.2.3 Imobilização de enzimas

As cargas enzimáticas dos biocatalisadores imobilizados foram; CALB a 1 mg de enzima/g de suporte; CALA e CRL a 4 mg de proteína/g de suporte, TLL a 12 mg de enzima/g de suporte. A carga enzimática foi selecionada para ter determinações de atividade confiáveis para todos os biocatalisadores e substratos, enquanto tenta evitar interações enzima-enzima que possam alterar os resultados (ARANA-PEÑA et al., 2020b; ZAAK et al.,

2017b). Todas as imobilizações foram acompanhadas medindo-se a atividade *p*-NPB da suspensão, sobrenadante e uma referência da enzima nas mesmas condições, mas onde foi utilizada agarose inerte.

5.3.2.3.1 Imobilização de lipases em grânulos de octil agarose

As soluções de lipases foram imobilizadas via ativação interfacial neste suporte (MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019, 2021). As soluções enzimáticas foram diluídas em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 e 25 °C e, em seguida, foi adicionado o suporte de octil agarose na proporção de 1 g de suporte: 10 mL de solução enzimática. A imobilização foi realizada sob agitação mecânica por 2 h, medindo a atividade do sobrenadante, suspensão e referência usando o ensaio *p*-NPB descrito acima. Quando a atividade do *p*-NPB não foi detectada no sobrenadante, os biocatalisadores foram filtrados, lavados com água destilada e armazenados em baixa temperatura (4 °C).

5.3.2.3.2 Imobilização de lipases em grânulos de octil-vinil sulfona agarose

As soluções de lipases foram diluídas em acetato de sódio 5 mM a pH 5,0 (para favorecer a ativação interfacial como principal causa de imobilização da enzima) e 25 °C e, em seguida, adicionou-se suporte de octil-vinilsulfona agarose na proporção de 1 g de suporte/10 mL de solução enzimática (ALBUQUERQUE et al., 2016). O ensaio *p*-NPB foi utilizado para acompanhar a atividade do sobrenadante, suspensão e referência (ALBUQUERQUE et al., 2016). Após, os biocatalisadores foram lavados com água destilada, filtrados a vácuo e recuperados. Para favorecer a formação da ligação covalente enzima-suporte, os biocatalisadores foram ressuspensos em carbonato de sódio 100 mM a pH 10,0 e 25 °C por 24 horas na mesma proporção. Em seguida, 10 mL de etilenodiamina 2 M em pH 10,0 e 25 °C foram preparados e adicionados em 1 g de biocatalisadores por 48 horas, para modificar as porções residuais de sulfona de vinil. Por fim, os biocatalisadores foram lavados com água destilada, filtrados a vácuo e armazenados em geladeira a 4 °C.

5.3.2.3.3 Imobilização de lipases em grânulos de amino-glutaraldeído-agarose

Todas as lipases foram imobilizadas em amino-glutaraldeído-agarose utilizando 1 g de suporte em 10 mL de solução enzimática preparada em fosfato de sódio 5 mM em pH 7,0 e 25°C por 2 horas. A imobilização foi seguida medindo-se a atividade de *p*-NPB do

sobrenadante, suspensão e soluções de referência. Após a imobilização, os biocatalisadores foram lavados com água, secos a vácuo e armazenados em geladeira.

5.3.2.4 Determinação da atividade enzimática usando diferentes substratos

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como μmol de substrato hidrolisado pela enzima por minuto e quantidade de enzima ou biocatalisador, nas condições do ensaio.

*5.3.2.4.1 Hidrólise de *p*- NPB*

50 μL de *p*- NPB 50 mM dissolvido em acetonitrila foram adicionados a uma cubeta com 2,5 mL de fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0. Para inicializar a reação, 50 μL (solução de enzima livre ou suspensão de enzima imobilizada) foram adicionados. A quantificação da atividade da lipase foi realizada determinando o aumento da absorbância em 348 nm produzida pela liberação de *p* -NPB (ponto isosbético de *p* -NP, seu ε nessas condições é de $5150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por 90s (LOMBARDO; GUY, 1981), sob temperatura regulada (25°C) e agitação magnética.

5.3.2.4.2 Hidrólise de triacetina

Uma massa de 20–90 mg de biocatalisador foi adicionada à 5 mL de 50 mM de triacetina em solução tampão de acetato de sódio 50 mM a pH 5,0 por 10 minutos, para reduzir a migração de acil (HERNANDEZ et al., 2011). As reações foram realizadas em diferentes temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C , e as atividades foram determinadas através dos graus de conversão (15–20%) para a produção de 1,2 diacetina, onde o tempo de retenção foi de 4 min para os produtos e 18 min para o substrato. A fase móvel foi acetonitrila 15/85- água Milli-Q, com vazão de 1 mL/min em um HPLC, Jasco UV 15–75 (Jasco, Madrid, Espanha) usando uma coluna Kromasil C18 (15 cm \times 0,46 cm) com um detector de UV em 230 nm, injetando amostras de 20 μL .

5.3.2.5 Inativações térmicas e atividade recuperada

Porções de 0,5 g dos biocatalisadores foram suspensas em 4 mL de tampão Tris 10 mM a pH 7,0 em um banho a 70 ou 75 °C. Periodicamente, as amostras foram retiradas e suas atividades residuais foram medidas usando o ensaio *p*-NPB descrito acima considerando 100% da atividade inicial da preparação. Visando uma comparação das estabilidades das enzimas com os dois substratos, periodicamente, alíquotas de 400 µL do biocatalisador de inativação foram retiradas em tempos específicos e adicionadas em 3 mL de triacetina 50 mM a 25 e 55°C em um reator sob agitação magnética e amostras foram retirados a cada 10 minutos para analisar suas atividades conforme descrito acima. Em paralelo, alíquotas de 50 µL da suspensão do biocatalisador de inativação foram tomadas para medir sua atividade de *p*-NPB a 25°C.

5.4 Resultados

5.4.1 Imobilização das diferentes enzimas

As imobilizações de CALA, CALB, TLL e CRL foram realizadas conforme descrito nos métodos. Em todos os casos o protocolo de imobilização permitiu a total imobilização da atividade enzimática ofertada (resultados não mostrados). A Tabela 5.1 mostra a atividade dos diferentes biocatalisadores usando *p*-NPB ou triacetina , a 25 °C. Não mostramos os dados usando enzima livre, pois isso é fortemente dependente da agregação das lipases com outras moléculas de lipase ou outros componentes do extrato (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2003; PALOMO et al., 2003, 2004, 2005; WILSON et al., 2006a), o que pode alterar as características da enzima e tornar os resultados muito dificeis de entender.

Tabela 5.1. Atividades dos diferentes biocatalisadores na hidrólise de *p*-NPB 1 mM em pH 7,0 e triacetina 50 mM em pH 5,0 e 25 °C. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito em Métodos.

Biocatalisador	Atividade (U/g)							
	CALA		CALB		TLL		CRL	
	<i>p</i> -NPB	Triacetina	<i>p</i> -NPB	Triacetina	<i>p</i> -NPB	Triacetina	<i>p</i> -NPB	Triacetina
Octil	87,57	25,06	23,68	38,57	162,14	91,03	78,15	9,08
Glutaraldeído	45,19	6,38	16,85	76,71	*	*	97	3,3
DVSF	98,26	10,63	29,22	26,18	124,27	50,22	128,53	7,02

Fonte: Elaborada pela autora.

No caso da CALA, utilizando o *p*-NPB para determinar a atividade residual, o biocatalisador menos ativo foi o preparado sobre aminoglutaraldeído, que apresentou metade da atividade das outras duas preparações. A preparação mais ativa foi aquela preparada com octil-VS (quase 15% mais ativo que octil-CALA). Usando triacetina como substrato, a situação foi diferente. Agora, a preparação mais ativa é o octil-CALA, 2,5 vezes mais ativo que o octil-VS-CALA e quatro vezes mais que o aminoglutaraldeído-CALA (Tabela 5.1). Todos os biocatalisadores da CALA foram mais ativos versus *p*-NPB do que versus triacetina, mas a especificidade do substrato diferiu para cada biocatalisador.

Usando CALB (Tabela 5.1), novamente a preparação mais ativa versus *p*-NPB é octil-VS-CALB, enquanto a menos ativa é amino-glutaraldeído-CALB (55%). Mais uma vez, a ligação covalente e as etapas de bloqueio renderam um biocatalisador mais ativo ao preparar octil-VS do que apenas a enzima ativada na interface. A situação se reverte totalmente com o uso da triacetina, neste caso o preparado mais ativo é o aminoglutaraldeído-CALB, quase dobrando a atividade do octil-CALB; enquanto octil-VS-CALB apresentou cerca de 70% da atividade do octil-CALB. De fato, octil-VS-CALB foi mais ativo versus *p*-NPB do que a triacetina, enquanto o aminoglutaraldeído-CALB foi 4,5 vezes mais ativo do que a triacetina, e o octil-CALB foi apenas 1,6 vezes mais ativo do que a triacetina. As mudanças na especificidade da enzima são mais intensas neste caso do que usando CALA.

Usando TLL, a enzima imobilizada em amino-glutaraldeído foi quase totalmente inativa usando ambos os substratos, e foi descartada para estudos posteriores. Os outros dois biocatalisadores foram mais ativos versus *p*-NPB do que versus triacetina. Octil-TLL foi

mais ativo que octil-VS-TLL para ambos os substratos, sendo a diferença ligeiramente maior usando triacetina.

Finalmente, usando CRL, todos os biocatalisadores foram muito mais ativos versus *p*-NPB do que versus triacetina. Utilizando *p*-NPB, o octil-VS-CRL foi o biocatalisador mais ativo, seguido pelo amino-glutaraldeído-CRL (cerca de 75%) e o menos ativo foi o octil-CRL (cerca de 60%). No entanto, este último foi o mais ativo contra triacetina, seguido por octil-VS-CRL (mais de 75%) e amino-glutaraldeído-CRL (mais de 35%).

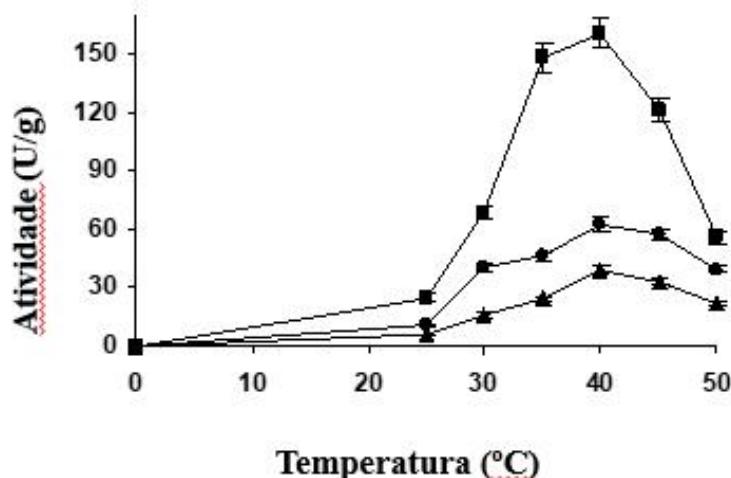
Esses resultados concordam com as mudanças na especificidade e atividade enzimática causadas pelo protocolo de imobilização e relatadas em muitas instâncias diferentes (AHAMMAD, S. Z.; GOMES, J.; SREEKRISHNAN, 2008; ARANA-PEÑA et al., 2020b; CHAUBEY et al., 2006; DOS SANTOS et al., 2015c; DU et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2021; LOKHA et al., 2020b; SABBANI; HEDENSTRÖM; NORDIN, 2006; SOUZA et al., 2021; TAKAÇ; BAKKAL, 2007). Isso sugere que as mudanças conformacionais induzidas pelas ligações covalentes e as interações com os grupos amino no suporte durante a etapa de bloqueio (ALBUQUERQUE et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2015b, 2015c; SANTOS et al., 2015b; SOUZA et al., 2021), geralmente produziam uma forma enzimática de alguma forma mais ativa do que a enzima apenas ativada interfacialmente para *p*-NPB, enquanto essas formas enzimáticas são geralmente menos eficazes na hidrólise da triacetina. O glutaraldeído, por não imobilizar a forma aberta da enzima como no caso da octil-agarose (MANOEL et al., 2015), costuma ser o biocatalisador menos ativo (as exceções são CRL versus *p*-NPB, e CALB versus triacetina). Contudo, esse fato tornou-se mais evidente no caso da triacetina do que no caso da *p*-NPB. Isso sugere que pode ser conveniente verificar a atividade enzimática das preparações imobilizadas com o substrato alvo e não apenas com o colorimétrico sintético antes de tomar decisões relacionadas à adequação de um biocatalisador específico para um processo específico relacionado à atividade enzimática.

5.4.2 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade das diferentes preparações de CALA

A Figura 5.1 mostra o efeito da temperatura na atividade versus triacetina de todos os biocatalisadores CALA descritos acima. O *p*-NPB foi descartado para este experimento devido à rápida decomposição química deste substrato em alta temperatura, que impediu a

realização de determinações de atividade confiáveis. A Figura 5.1 mostra que, em todos os casos, as atividades máximas foram encontradas a 40 °C, com formas relativamente semelhantes até atingir esta temperatura: de 25 °C para 40 °C a atividade aumentou de 5,9 (para octil-VS-CALA) para 6,4 vezes (para octil-CALA). A diminuição da atividade a 50 °C foi mais acentuada usando octil-CALA (diminuindo quase três vezes) e mais suave usando amino-glutaraldeído-CALA (1,8 vezes) ou octil-VS-CALA (menos de 1,6).

Figura 5.1. Atividades dos diferentes biocatalisadores CALA immobilizados (4 mg/g) com 50 mM de triacetina em pH 5,0 em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-CALA; triângulos: Glutaraldeído-CALA e círculos: Octil-VS-CALA. As experiências foram realizadas conforme descrito em Métodos.



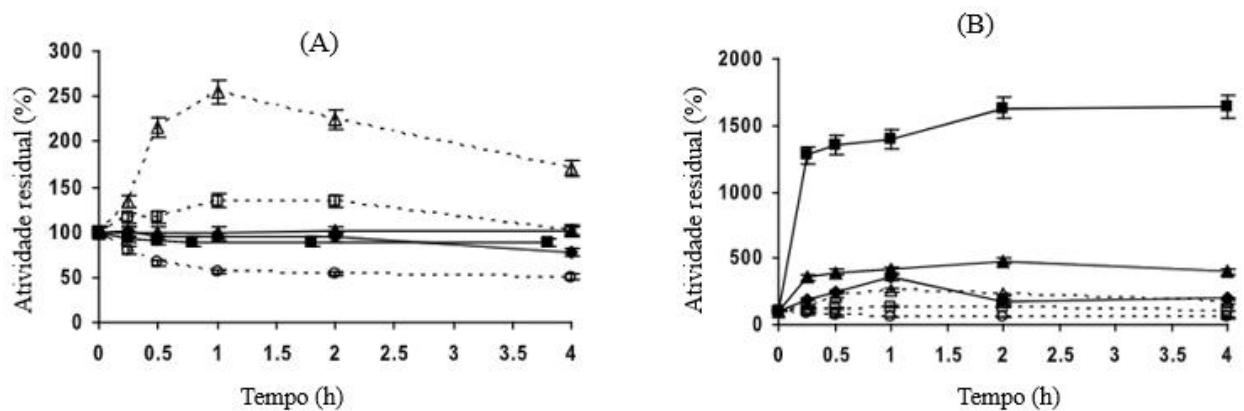
Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, quando os biocatalisadores foram incubados a 55 °C, nenhuma inativação de atividade foi detectada após 4 horas para nenhum dos biocatalisadores (resultados não mostrados).

Dessa forma, incubamos os biocatalisadores a 75 °C (Figura 5.2). Se a atividade for seguida usando *p*-NPB a 25°C, o único biocatalisador que reteve total atividade após 4 horas de incubação foi o aminoglutaraldeído-CALA, sendo o octil-VS-CALA a preparação menos estável. A situação com a triacetina é diferente, pois detecta-se um aumento inicial da atividade com a preparação de amino-glutaraldeído-CALA (mais do que duplicando a atividade inicial) e octil-CALA (aumentando a atividade em um terço), que diminuiu lentamente. Octil-VS-CALA diminuiu sua atividade desde o início da inativação, ainda mais rapidamente do que usando *p*-NPB para determinar a atividade residual da enzima. No entanto, a situação torna-se totalmente diferente se a determinação da atividade for realizada a

55 °C. Octil-CALA multiplicou a atividade inicial em mais de 16 vezes após 2 horas e reteve essa atividade após 4 horas. Amino-glutaraldeído-CALA também aumentou a atividade inicial, mas “apenas” por um fator de 5 vezes após 2 horas e diminuiu após 4 horas. Mesmo a enzima immobilizada em VS-octil aumentou inicialmente a atividade (em 3,5 vezes). Dessa forma, não apenas a estabilidade quantitativa dos biocatalisadores é influenciada pelas condições de determinação da atividade, mas também os valores qualitativos são diferentes, pois em alguns casos o amino-glutaraldeído-CALA é o mais resistente e em outros casos, o octil-CALA pode ser considerado o mais estável. Também fica evidente uma discrepância com os 40 °C encontrados para a temperatura ótima, pois a incubação a 75 °C aumentou a atividade detectada nessas temperaturas. Assim, determinando a atividade a 55 °C, para esta enzima a atividade residual durante a incubação em altas temperaturas foi maior em todos os casos do que usando 25 °C, contrariando a hipótese inicial.

Figura 5.2. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALA na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*- NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*- NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.

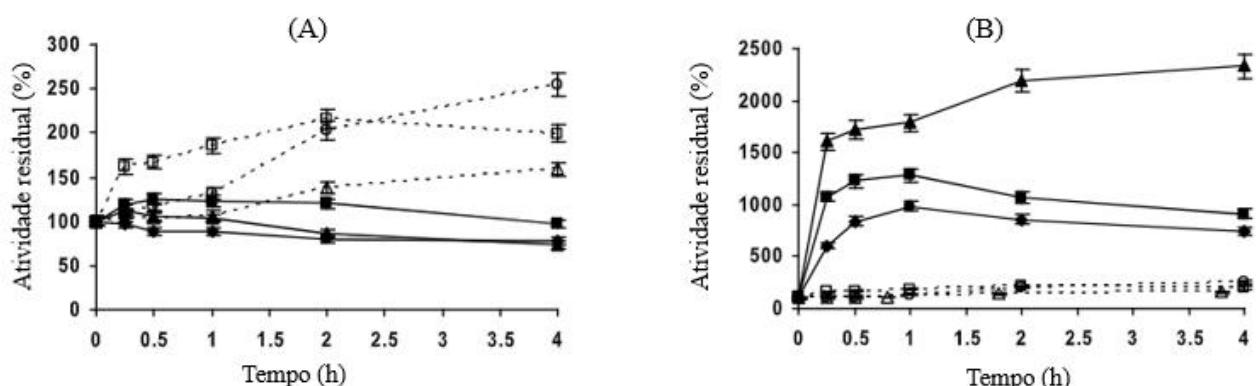


Fonte: Elaborada pela autora.

Para analisar se essa tendência também foi encontrada em outras temperaturas, os biocatalisadores foram incubados a 70 °C, uma temperatura também acima da ideal (Figura 3). Nesta temperatura, octil-CALA aumentou progressivamente sua atividade versus triacetina ao determinar a atividade residual a 25 °C para quase dobrar o valor da atividade inicial após 4 horas, enquanto a atividade usando *p*-NPB como substrato, diminuiu ligeiramente após 4 horas. Usando octil-VS-CALA, o aumento da atividade versus triacetina foi semelhante (2,5 vezes após 4 horas), enquanto a atividade versus *p*-NPB diminuiu para menos de 80% após

esse período. Finalmente, usando a preparação de glutaraldeído, um menor aumento na atividade enzimática foi encontrado na hidrólise da triacetina (menos de 1,6 vezes após 4 horas), enquanto a diminuição da atividade enzimática versus *p*-NPB foi em torno de 30% após 4 horas.

Figura 5.3. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALA na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

A inativação determinando a atividade versus triacetina a 55 °C é mostrada na Figura 5.3 . Essa temperatura também foi maior do que a temperatura ideal para esses biocatalisadores, 40 °C (Figura 5.1). A atividade de todas as preparações CALA aumentou ao longo do tempo. A octil-CALA atingiu uma atividade quase doze vezes maior (semelhante à encontrada a 75 °C) e a octil-VS-CALA dez vezes maior que a inicial (muito maior que a observada a 75 °C), e então diminuiu, mas após 4 horas eles permaneceram hiperativados (900 ou 750%, respectivamente). O caso do amino-glutaraldeído-CALA foi mais significativo, no qual a atividade versus triacetina determinada a 55 °C aumentou de forma contínua para atingir um valor de mais de 2300%, atingindo este valor após 4 horas (quando incubado a 75 °C este valor de hiperativação foi muito menor para este biocatalisador).

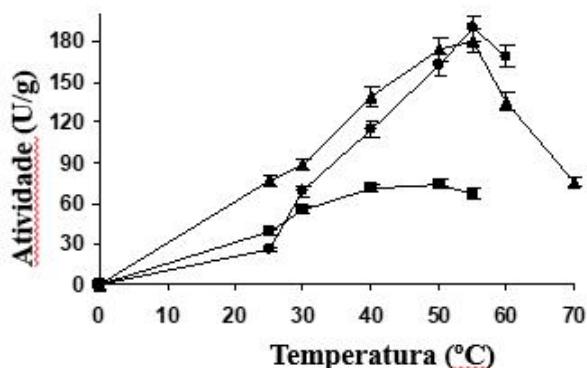
Este aumento da atividade enzimática deve estar correlacionado com a geração, em temperaturas mais elevadas, de formas enzimáticas imobilizadas mais adequadas para hidrolisar a triacetina do que a forma inicial, sendo mais favorável para a enzima imobilizada em aminoglutaraldeído.

De qualquer forma, os resultados desse conjunto de experimentos tornam muito complexo definir qual é a preparação mais estável de CALA, e esse problema é acentuado se a atividade for determinada usando triacetina a 55 °C, onde a atividade da enzima aumentou significativamente. Usando amino-glutaraldeído-CALA, isso pode estar relacionado ao favorecimento da forma aberta da lipase em altas temperaturas (que pode levar algum tempo), enquanto usando octil ou octil-VS talvez possa ser explicado pela redução da intensidade de a adsorção da enzima à camada octila, possivelmente diminuindo os impedimentos estéricos à entrada do substrato gerados pela superfície de suporte. A dúvida pode ser se a atividade reflete a estabilidade da enzima, pois uma maior hiperativação pode refletir uma maior mobilidade na estrutura da enzima, sugerindo realmente uma menor rigidez da enzima.

5.4.3 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade das diferentes preparações de CALB

A Figura 5.4 mostra o perfil de atividade/temperatura para os 3 biocatalisadores CALB. Enquanto a temperatura ideal é de 50 °C para octil-CALB, é de 55 °C para as outras duas preparações. A forma da curva é muito diferente para os biocatalisadores. Octil-CALB tem atividade próxima ao máximo a 40 °C, com aumento menor que 5% a 50 °C, quase dobrando a atividade a 25 °C. Amino-glutaraldeído-CALB tem mais que o dobro da atividade a 50 °C do que a 25 °C, com um aumento marginal a 55 °C. Octil-VS-CALB apresentou um aumento importante na atividade entre 40 °C e 50 °C (em torno de 40%), que aumentou ainda mais de 15% quando a atividade é determinada a 55 °C. A esta temperatura, este biocatalisador tornou-se o mais ativo contra este substrato (inicialmente era o menos ativo).

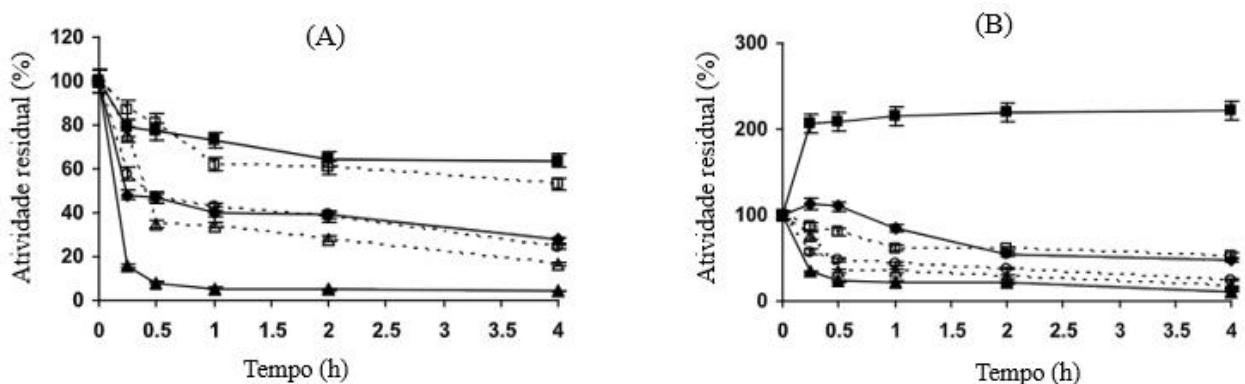
Figura 5.4. Atividades dos diferentes biocatalisadores de CALB (1 mg/g) imobilizados com 50 mM de triacetina (pH 5,0) em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-CALB; triângulos: Glutaraldeído-CALB e círculos: Octil-VS-CALB. As experiências foram realizadas conforme descrito em Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 5.5 mostra a inativação dos diferentes biocatalisadores de CALB usando *p*-NPB e triacetina a 75 °C. Usando *p*-NPB e 25 °C para determinar a atividade da enzima, o biocatalisador menos estável foi o amino-glutaraldeído-CALB, quase totalmente inativo após 1 hora. Octil-CALB (mais de 60% de atividade retida após 4 horas) é mais estável que octil-VS-CALB (menos de 30% após 4 horas). Usando triacetina, o curso de inativação é semelhante ao usando *p*-NPB ao estudar octil-VS-CALB. No entanto, a atividade retida é bem maior usando amino-glutaraldeído-CALB e este substrato, tornando-se semelhante ao curso de inativação de octil-VS-CALB. Octil-CALB continua sendo o biocatalisador mais estável, embora a diminuição da atividade usando este substrato seja ligeiramente maior. Ao medir a atividade a 55 °C, os resultados foram bastante diferentes. A atividade de octil-CALB aumentou em mais de um fator duplo após 15 minutos a 75 °C e então permaneceu inalterada pelas próximas 3,5 horas. Usando amino-glutaraldeído-CALB, a atividade residual é ainda menor do que se a atividade for determinada a 25 °C. Finalmente, usando octil-VS-CALB, após um aumento inicial de atividade, diminuiu para menos da metade do inicial após 4 horas.

Figura 5.5. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALB na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.

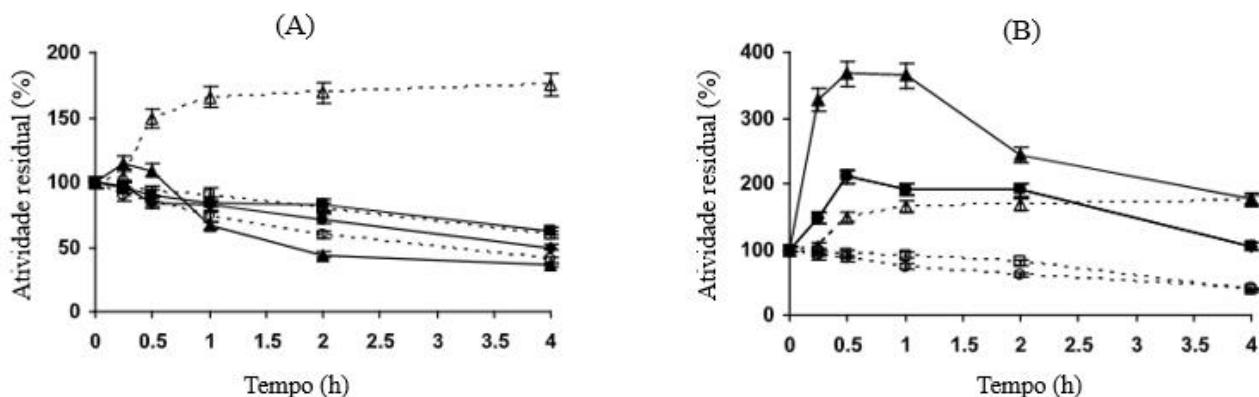


Fonte: Elaborada pela autora.

As preparações de CALB imobilizadas também foram inativadas a 70 °C (Figura 5.6). Começando com a medição da atividade a 25 °C, a atividade do octil-CALB diminuiu de forma semelhante usando triacetina ou *p*-NPB (para cerca de 60% após 4 horas, semelhante aos resultados a 75 °C). Octil-VS-CALB é ligeiramente menos estável do que octil-CALB, mantendo 50-40% da atividade inicial após 4 horas com *p*-NPB ou triacetina,

respectivamente. Os resultados foram diferentes ao utilizar-se amino-glutaraldeído-CALB após incubação a 70 ou 75 °C. Agora, a atividade enzimática aumentou de forma progressiva usando triacetina como substrato (atingindo um valor de 175% após 4 horas), enquanto usando *p*-NPB, a atividade diminuiu mais do que usando os outros dois biocatalisadores. Ou seja, usando triacetina este foi o biocatalisador que reteve o maior percentual de atividade, enquanto que utilizando *p*-NPB, reteve os menores valores. Em seguida, determinou-se a atividade das amostras versus triacetina, mas a 55 °C. Octil-CALB aumentou sua atividade em quase cinco vezes após 15 minutos, e depois diminuiu lentamente esse valor (ainda mantendo a atividade inicial triplicada após 4 horas). Octil-VS-CALB aumentou duas vezes sua atividade após 30 minutos, e depois diminuiu, com uma atividade recuperada de pouco mais de 100% após 4 horas. O biocatalisador aminoglutaraldeído aumentou a atividade em menos de quatro vezes após 15 minutos e sua atividade diminuiu para manter a atividade de 174% após 4 horas.

Figura 5.6. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CALB na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.



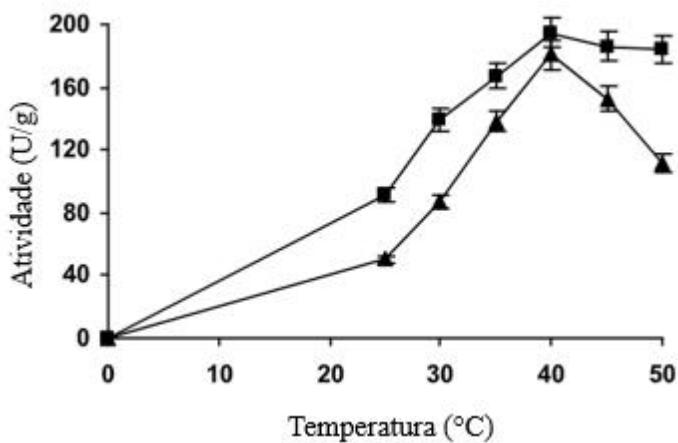
Fonte: Elaborada pelo autor.

Novamente, a evolução da atividade enzimática para cada biocatalisador dependeu do substrato e da temperatura utilizada para determinar a atividade residual.

5.4.4 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade das diferentes preparações de TLL

Usando esta enzima, a atividade empregando o suporte amino-glutaraldeído é muito baixa para os experimentos. Dessa forma, apenas os biocatalisadores octil e octil-VS foram comparados. A Figura 5.7 mostra os perfis de atividade/temperatura para esses biocatalisadores usando triacetina como substrato. Ambos os biocatalisadores tiveram a mesma temperatura ótima (40°C), mas enquanto o octil-TLL multiplicou sua atividade por 2 ao passar de 25°C para 40°C , o octil-VS-TLL aumentou sua atividade em 3,5 vezes após esse aumento de temperatura. Dessa forma, a 40°C , a atividade de ambos os biocatalisadores versus a triacetina tornaram-se semelhante. A diminuição da atividade em temperaturas mais altas é diferente para cada biocatalisador, enquanto o octil-TLL manteve 95% da atividade máxima a 50°C , o octil-VS-TLL diminuiu a atividade para cerca de 60%.

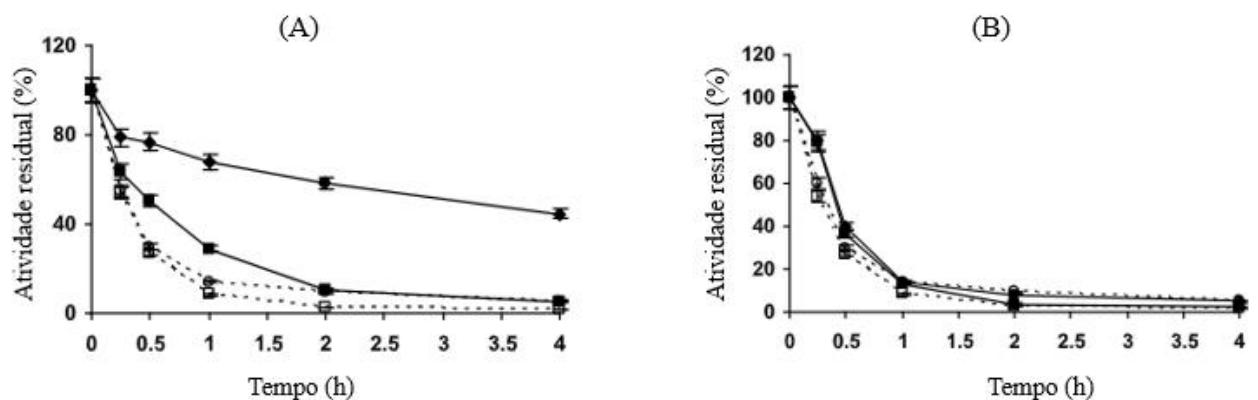
Figura 5.7. Atividades dos diferentes biocatalisadores TLL imobilizados (12 mg/g) com triacetina 50 mM (pH 5,0) em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-TLL e triângulos: Octil-VS-TLL. As experiências foram realizadas conforme descrito em Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 5.8 mostra as inativações térmicas a 75°C . Usando *p*-NPB e 25°C para determinar a atividade residual, os maiores valores são encontrados usando octil-VS-TLL (44% após 4 horas versus os 5% retidos por octil-TLL). Usando triacetina e 25°C para determinar a atividade residual, as diferenças são menores, pois principalmente octil-VS-TLL perdeu muito mais atividade do que usando *p*-NPB (manteve 15% após apenas 1 hora) mostrando cursos de inativação bastante semelhantes aos de octil-TLL. Os resultados ao determinar a atividade a 55°C usando triacetina foram bastante semelhantes.

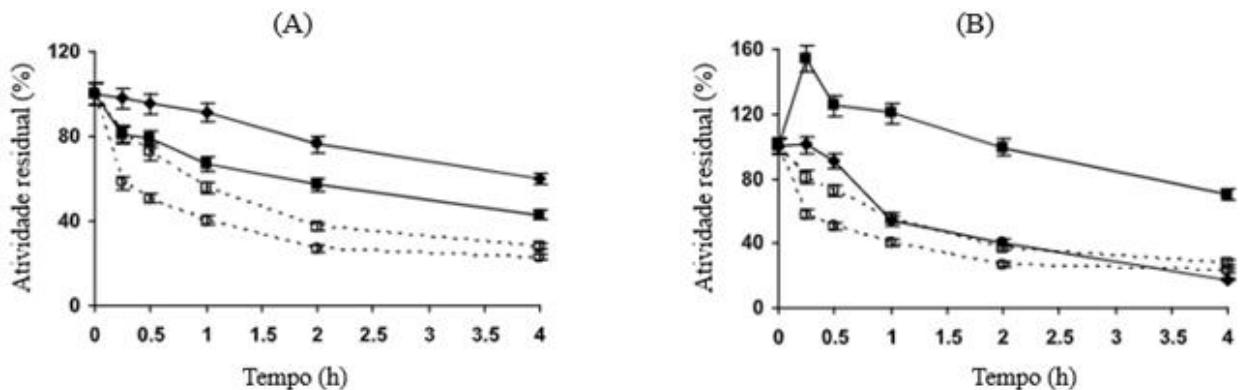
Figura 5.8. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores TLL na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

A inativação a 70 °C fornece uma imagem de certa forma diferente (Figura 5.9). Determinando a atividade a 25 °C, octil-TLL mostra uma perda de atividade ligeiramente maior versus triacetina (27% de atividade residual após 4 hora) do que versus *p*-NPB (42% de atividade residual após 4 hora). Octil-VS-TLL reteve menos atividade versus triacetina (23% de atividade residual após 4 horas) do que octil-VS-TLL, mas mais atividade foi mantida usando *p*-NPB (60%). Se a atividade foi determinada a 55 °C com triacetina, a octil-TLL apresentou um aumento inicial de atividade (160% após 15 minutos) que diminuiu lentamente ao longo do tempo (até 70% da atividade inicial após 4 horas). Octil-VS-TLL apresentou um curso de inativação totalmente diferente, diminuindo sua atividade de forma contínua desde o início, mantendo-se abaixo de 20% da atividade inicial após 4 horas. Novamente, dependendo da condição de determinação da atividade, a preparação mais estável pode ser uma ou outra.

Figura 5.9. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores TLL na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.

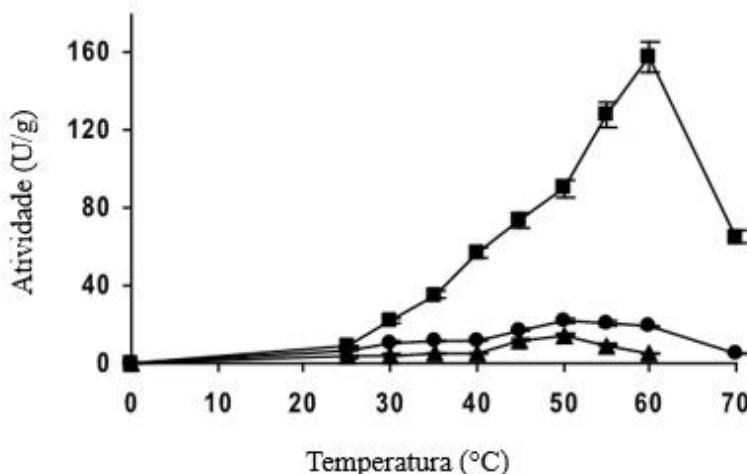


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.5 Determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade de diferentes preparações de CRL

Por fim, foram analisadas as características das diferentes preparações de CRL. A Figura 5.10 mostra os perfis de atividade/temperatura desses biocatalisadores. Octil-CRL mostra atividade máxima a 60 °C. Esta é a maior temperatura ótima encontrada nesta pesquisa, o que foi de certa forma inesperado, pois em termos de estabilidade, esta é uma enzima considerada menos estável do que as outras 3 enzimas incluídas neste estudo (CARBALLARES; ROCHA-MARTIN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022). Os outros dois biocatalisadores apresentaram atividade máxima a 50 °C, mas enquanto a atividade do octil-DVS apresentou quase um platô de 50 a 60 °C, o amino-glutaraldeído-CRL perdeu 2/3 de sua atividade a 60 °C. Octil-CRL aumentou sua atividade quase dez vezes de 25 °C para 50 °C, enquanto octil-VS-CRL aumentou a atividade apenas por um fator de 3.

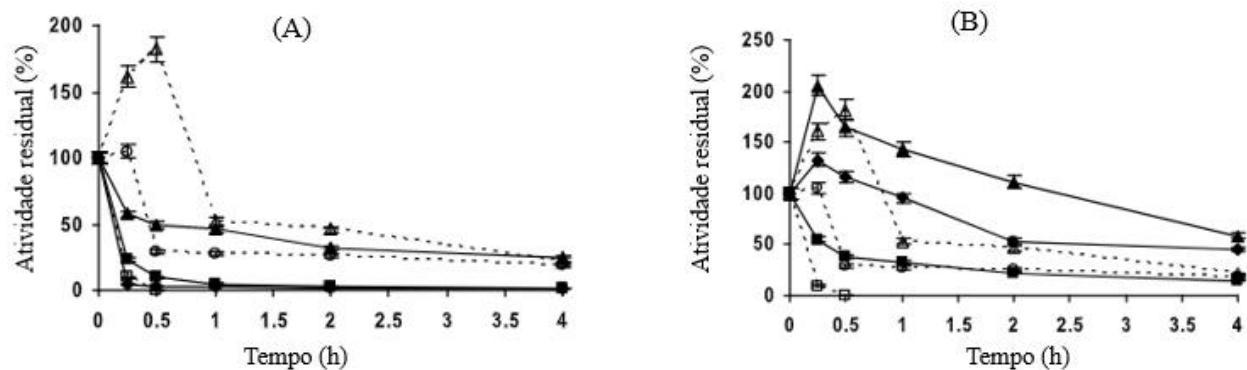
Figura 5.10. Atividades dos diferentes biocatalisadores CRL immobilizados (4 mg/g) com triacetina 50 mM (pH 5,0) em diferentes temperaturas. Quadrados: Octil-CRL; triângulos: Glutaraldeído-CRL e círculos: Octil-VS-CRL. As experiências foram realizadas conforme descrito em Métodos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os cursos de inativação desses biocatalisadores a 75 °C são mostrados na Figura 5.11 . Utilizando *p*-NPB, o biocatalisador que reteve a maior atividade foi o aminoglutaraldeído-CRL, sendo o octil CRL ligeiramente mais estável que o octil-VS-CRL. Usando triacetina a 25°C para determinar a atividade da enzima, o curso de inativação da octil-CRL é semelhante ao usando *p*-NPB, mas octil-VS-CRL inicialmente mostrou um ligeiro aumento na atividade seguido por uma rápida perda de atividade. Amino-glutaraldeído-CRL aumentou sua atividade nos primeiros tempos de inativação (para 80% após 30 minutos), mas posteriormente a atividade residual diminuiu, atingindo valores semelhantes aos do octil-VS-CRL após 4 horas. Os resultados são muito diferentes medindo as atividades a 55 °C. Já a octil-CRL reteve uma porcentagem significativa de atividade mesmo após 4 horas (15%), embora tenha permanecido como a de menor atividade recuperada. O amino-glutaraldeído-CRL apresentou uma hiperativação inicial semelhante ao uso de 25 °C, mas a atividade diminuiu de forma mais lenta, e o octil-VS-CRL teve um comportamento semelhante, mas com uma hiperativação menor.

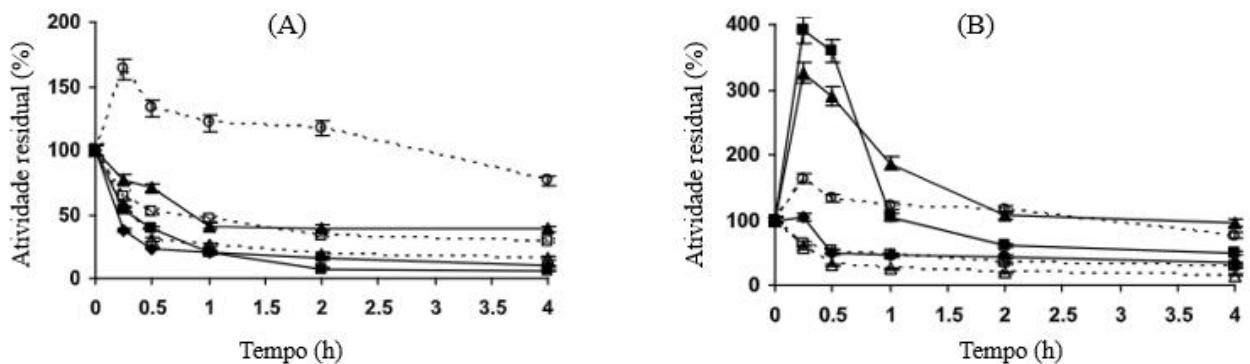
Figura 5.11. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CRL na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 75 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 5.12 mostra os cursos de inativação a 70 °C. Começando pela determinação da atividade a 25 °C, octil-CRL perdeu 2/3 da atividade inicial da triacetina após 4 horas, enquanto que, com o uso do *p*-NPB, manteve apenas 5% após 2 horas. Octil-VS-CRL reteve mais atividade após 4 horas de inativação, 76% versus triacetina (na verdade a atividade aumentou nos primeiros tempos de inativação) e 10% versus *p*-NPB. Amino-glutaraldeído-CRL manteve 15% da atividade inicial versus triacetina, porém, a atividade versus *p*-NPB, após cair para 40% nas primeiras 2 horas, manteve-se após 4 horas. Os resultados foram muito diferentes ao determinar a atividade versus triacetina a 55 °C. Octil-CRL mostrou um aumento de quatro vezes na atividade após 15 minutos, contudo, posterior a esse tempo, uma diminuição do valor apresentando 50% de atividade após 4 horas de curso. Octil-VS-CRL não apresentou esse aumento na atividade enzimática, mas a atividade residual foi de 33% após 4 horas, muito maior do que quando a atividade foi determinada a 25 °C. Amino-glutaraldeído-CRL mostrou a melhor retenção de atividade, com um incremento inicial de mais de três vezes, e diminuição lenta para 95% após 4 horas.

Figura 5.12. Valores de atividade de diferentes biocatalisadores CRL na hidrólise de *p*-NPB 1 mM ou triacetina 50 mM. As amostras foram retiradas durante os cursos de inativação realizados em pH 7,0 e 70 °C. (A) Hidrólise a 25°C de *p*-NPB (pH 7,0) e triacetina (pH 5,0). Símbolos sólidos: *p*-NPB e símbolos vazios: Triacetina. (B) Hidrólise da triacetina a pH 5,0. Símbolos sólidos: 55 °C e símbolos vazios: 25 °C. quadrados: biocatalisadores octílicos; triângulos: biocatalisadores de glutaraldeído; círculos: biocatalisadores Octil-DVSF. Outras especificações são descritas na seção Métodos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a complexidade da inativação da enzima imobilizada e, portanto, a complexidade até mesmo para qualificar a estabilidade funcional da enzima. Já havia sido demonstrado que as vias de inativação de enzimas imobilizadas podem ser determinadas pela rigidez enzimática de áreas específicas ou por interações enzima-suporte (SANCHEZ et al., 2016; SOUZA et al., 2021). Aqui, mostramos que a situação pode ser ainda mais complexa.

Por um lado, a atividade ótima para as diferentes enzimas imobilizadas incluídas neste estudo é muito curta em comparação com a temperatura em que a atividade das enzimas começa a diminuir quando elas são submetidas a estudos de inativação de estresse de longo prazo. Além disso, não há uma ordem direta na estabilidade determinada usando inativação de estresse e temperatura ótima, nem para estabelecer uma ordem para as enzimas nem os diferentes biocatalisadores de cada enzima. Nesse sentido, o aminoglutaraldeído-CRL poderia ser uma exceção, sendo o biocatalisador de CRL mais estável (pelo menos usando triacetina) e é o que apresenta a maior temperatura ótima entre as preparações de CRL.

Por outro lado, também é evidente que a “meia” vida de uma enzima na inativação por estresse depende fortemente das condições de determinação da atividade. Pode-se esperar que

as mudanças conformacionais causadas pela inativação da enzima possam afetar diferentemente a atividade versus diferentes substratos, e dessa forma pode-se esperar que uma enzima não perca a mesma porcentagem de atividade se o substrato usado para determinar a atividade residual for diferente (SOUZA et al., 2021). Nos exemplos utilizados neste trabalho, apenas o biocatalisador CALB mostra cursos de inativação relativamente semelhantes usando triacetina e *p*-NPB a 25 °C. Para TLL, a atividade diminuiu mais rapidamente usando triacetina, enquanto para CALA e RML esse substrato deu as maiores atividades residuais (exceto para octil-VS-CALB). Em alguns casos, a atividade diminuiu com um substrato (geralmente com *p* -NPB, o substrato mais usado para acompanhar esses processos usando lipases), enquanto com triacetina, a atividade aumentou. Isso ocorreu principalmente quando a inativação é realizada a 70°C (todas as enzimas possuem algum biocatalisador que aumenta a atividade com algum substrato), mas também existem alguns exemplos ao inativar a enzima a 75 °C (por exemplo, octil ou amino-glutaraldeído- CALA) (ver Figura 5.2).

No entanto, os resultados mais surpreendentes foram observados ao determinar a atividade da enzima a 55 °C. Essa temperatura está acima da temperatura ideal ao usar o biocatalisador imobilizado de CALA, TLL e CRL (exceto a preparação de glutaraldeído) e é a temperatura ideal para algumas preparações de CALB (exceto octil que tem atividade máxima a 50°C). Conforme explicado na introdução, espera-se que a temperatura ideal seja uma consequência da distorção da estrutura da enzima (GLOWACKI; HARVEY; MULHOLLAND, 2012) juntamente com a sensibilidade à temperatura alterada do substrato-enzima, estágios de transição enzima-produto, capacidade de calor de enzimas ligadas intermediários, estado iônico no centro ativo da enzima (DELONG et al., 2017; GLOWACKI; HARVEY; MULHOLLAND, 2012; GÜRDAS; GÜLEÇ; MUTLU, 2012; KEKENES-HUSKEY; SCOTT; ATALAY, 2016; YADAV; PRAKASH, 2009). Ao medir a atividade da enzima bem abaixo desta temperatura ótima (por exemplo, a 25 °C), espera-se que a enzima submetida a condições muito mais severas possa reativar parcialmente a esta temperatura mais amena mesmo durante o tempo de determinação da atividade, e assim a atividade determinada pode ser maior do que manterá a enzima nas condições de inativação, e esse efeito pode ser mais significativo quando as incubações nas condições mais brandas forem mais longas (RODRIGUES et al., 2009c, 2009b, 2009a; RUEDA et al., 2015a; SOLER et al., 1997; SUESCUN et al., 2015).

No entanto, utilizando temperaturas acima dessa temperatura, essa reativação deve ser reduzida, pois supõe-se que seja uma temperatura que afeta a estrutura da enzima (GLOWACKI; HARVEY; MULHOLLAND, 2012). No entanto, esses resultados apontam que, de forma geral, as enzimas imobilizadas utilizadas neste estudo apresentam um aumento significativo da atividade a 55 °C quando são previamente incubadas a 70 ou 75 °C, com exceção da TLL. A Octil-TLL aumentou sua atividade apenas em 60% e de forma muito transitória, quando incubada a 70 °C (Figura 5.9). Para as demais preparações, esse aumento de atividade atingiu valores de até 15 vezes para octil-CALA incubado a 75 °C ou quase 25 vezes para o glutaraldeído quando incubado a 70 °C, e os valores permaneceram acima de 100% em todos os tempos estudados (Figura 5.2, Figura 5.3). Isso sugere que se a enzima é incubada a 25 °C e depois exposta a 55 °C, a conformação que atinge é diferente daquela que apresenta se incubada previamente a 70 ou 75 °C. E que, por algum motivo, a incubação anterior em alta temperatura é positiva para a atividade versus triacetina. Pode estar relacionado à abertura da enzima (que pode ser mais fácil em altas temperaturas, mas pode levar algum tempo e não é observado quando se mede diretamente a 55 °C amostras armazenadas a 25 °C) ou uma acomodação da enzima em suas interações com o suporte, que de alguma forma permitem uma maior atividade (talvez reduzindo os impedimentos estéricos à entrada do substrato, talvez mudanças conformacionais diretas na enzima). Este aumento de atividade não é necessariamente uma vantagem, pois pode sugerir uma flexibilidade enzimática que pode alterar todas as características da enzima (por exemplo, se a enzima for utilizada na resolução de misturas racêmicas). Também é um problema se usar enzimas co-imobilizadas, pois se uma enzima diminui ou mantém sua atividade enquanto a outra enzima aumenta, o design cuidadoso do combi-biocatalisador, que envolve a seleção das taxas de atividade das enzimas, será perdido (HWANG; LEE, 2019; REN et al., 2019b; ROCHA-MARTÍN et al., 2012; ZHANG, 2011). Isso pode ser crítico se a enzima que aumenta a atividade for a primeira enzima da cadeia e o produto formado for instável e exigir a rápida modificação da enzima para ser convertido no produto alvo (ARANA-PEÑA et al., 2021). Dessa forma, uma questão em aberto é se esse incremento de atividade, que sugere alguma mobilidade da estrutura enzimática, na verdade significa uma estabilidade maior ou menor do que um biocatalisador cuja atividade permanece inalterada, visto que estabilidade significa manter as características iniciais da enzima.

Isso também levanta a questão sobre os resultados alcançados na determinação da temperatura ótima. Na maioria dos exemplos deste artigo, a atividade a 55 °C aumentou

significativamente se a enzima foi previamente incubada em alta temperatura. Do ponto de vista prático, parece evidente que para selecionar um biocatalisador para um processo específico, mesmo utilizando condições de inativação de estresse, a atividade residual deve ser determinada nas condições exatas em que a enzima será utilizada (temperatura, substrato e outras condições).

5.6 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam que não existe uma relação direta entre o valor da temperatura ótima e a estabilidade da enzima em todos os casos, e que ambos os dados devem ser usados para se ter uma melhor imagem da estabilidade da enzima. De fato, a estabilidade operacional pode ser a forma ótima de estabelecer a estabilidade enzimática de diferentes biocatalisadores, talvez até mesmo sob condições de estresse para tornar o tempo do experimento razoável.

As condições de atividade enzimática residual também determinaram o valor e até mesmo a ordem de estabilidade dos biocatalisadores enzimáticos, sendo que tanto a temperatura quanto o substrato são capazes de alterar totalmente o padrão de inativação.

Capítulo 6

*Modulação das propriedades da lipase
usando diferentes funcionalizações do suporte:
aplicação na síntese de ésteres aromáticos*

6.1 Resumo

As lipases são amplamente utilizadas em diversos meios reacionais devido a sua especificidade, estabilidade e atividade em condições diversas e por serem eficazes na catálise em uma diversidade de aplicações. Para isso, um protocolo de imobilização enzimático vem a ser uma ferramenta que possibilita a otimização das características citadas anteriormente. No presente trabalho, a lipase A de *Candida antarctica* foi imobilizada seguindo diferentes estratégias de imobilização, nos suportes de octil-agarose, octil-vinilsulfona e aminoglutaraldeído, por interação física e química distintas. Os rendimentos de imobilização não constataram diferenças relevantes entre eles, contudo, o biocatalisador formado pelo suporte octil-VS tenha apresentado um melhor resultado, no valor de 95%. A análise de SEM relatou diferenças em relação às rugosidades entre os suportes octil e aminoglutaraldeído, e inclusão de agregados entre os suportes octil e octil-VS. A análise por fluorescência (FRX) sugeriu, mediante presença do silício, que houve a incorporação de grupamentos vinilsulfona ao suporte de agarose. A síntese enzimática foi utilizada na preparação do aroma butirato de geranila a partir de um álcool primário, utilizando as diferentes imobilizações de CALA como catalisadores reacionais. Essa estratégia enzimática demonstrou ser uma possibilidade de ferramenta de aplicação da lipase A de *Candida antarctica* como uma alternativa de preparação sustentável e eficiente de aromas naturais.

Palavras-chave: Imobilização enzimática. Lipase A de *Candida antarctica*. Biocatálise. Síntese de aromas.

6.2 Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos que apresentam características vantajosas como a alta atividade, especificidade e seletividade quando inseridas em condições amenas (MATTOS; BAKKER, 2023; MEVADA; WANJE; PANDIT, 2022; WANG et al., 2023), sendo alternativas ao uso de catalisadores industriais. (ALCÁNTARA et al., 2022; BASSO; SERBAN, 2019; CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; DICOSIMO et al., 2013; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Dentre as enzimas mais utilizadas na biocatálise estão as lipases, por catalisarem uma vasta gama de reações (CAZABAN; WILSON; BETANCOR, 2016; HWANG; LEE, 2019; MARTÍNEZ-MEJÍA et al., 2019; RODA et al., 2022; STERGIOU et al., 2013), possuírem ampla especificidade, estabilidade e atividade (MATELJAK et al., 2019b; MATEO et al., 2007; SOUZA et al., 2022; WILSON et al., 2006a), sendo assim utilizadas em distintos meios reacionais (BASSO; SERBAN, 2019; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; GRUNWALD, 2015; LI et al., 2020). Elas pertencem a classe de hidrolases (E.C. 3.1.1.3), realizando não apenas as hidrólises das ligações éster dos triacilglicerídeos (produzindo diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres), como também atuantes na síntese de ésteres por meio de diferentes estratégias como esterificação (CHONGKHONG et al., 2007; STERGIOU et al., 2013; XIE; WANG, 2020) , transesterificação (BAJAJ et al., 2010; LUQUE; CLARK, 2011; NARWAL; GUPTA, 2013) e interesterificação (CAO et al., 2016; PENG et al., 2020; UTAMA et al., 2019) .

A estrutura das lipases é baseada na presença de um sítio ativo formado por uma tríade catalítica, que em sua maioria é composta por histidina , serina , ácido aspártico (BRZOZOWSKI et al., 1991b). Apresenta uma estrutura de cadeia polipeptídica que recobre o sítio ativo, denominada de tampa ou ABA, apresentando uma conformação aberta ou fechada (onde o centro ativo estará inativo devido ao isolamento com o meio reacional) que mudará de conformação de acordo com a natureza substrato em contato (VERGER, 1997a). A tampa pode ser representada por tamanhos distintos, como o presente na lipase B de *Candida antarctica* (CALB) que por ser pequena, não isola completamente o sítio ativo ao meio no qual está atuante (LUAN; ZHOU, 2017). Já na lipase de *Geobacillus thermocatenulatus* observa-se uma tampa dupla, representando uma estrutura mais aprimorada (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009). Um dos mecanismos de ação das lipases em meio aquoso é a chamada ativação interfacial, estando em equilíbrio com a conformação aberta (onde a tampa é deslocada expondo o sítio ativo à superfície hidrofóbica) e fechada. É

através da exposição do centro ativo, na forma aberta, que ocorre o aumento da atividade enzimática (GROCHULSKI et al., 1993; MARTINELLE; HOLMQUIST; HULT, 1995; MARUYAMA et al., 2000). Contudo, as lipases podem sofrer alteração no seu desempenho catalítico (HENRIQUE DA SILVA CAVALCANTI et al., 2022; LIN et al., 2015) quando inseridas em reações industriais, devido a condição proporcionada não ser compatível com o meio fisiológico (SALGADO; DOS SANTOS; VANETTI, 2022)(SHELDON; BRADY, 2022).

Para atender a essa problemática e considerando a alta solubilidade em água ser um fator inconveniente do uso enzimático em meios reacionais, têm-se desenvolvido estratégias que visem otimizar as propriedades enzimáticas, como a reutilização e recuperação da enzima, seletividade, especificidade e estabilidade, assim como problemas de inibição (ARANA-PEÑA et al., 2021; IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; KOZLOWSKA; PAUTER; SIONKOWSKA, 2018; MATEO et al., 2007; YADAV; PRAKASH, 2009). Dentre as estratégias utilizadas destaca-se a imobilização enzimática (BARBOSA et al., 2015; BILAL et al., 2019b; PINHEIRO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2009d; URRUTIA et al., 2018; ZHAO et al., 2015) tendo por uso diferentes suportes (BARBOSA et al., 2013; DE MELO et al., 2017; LIMA et al., 2015; MORELLON-STERLING; BOLIVAR; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022; ROCHA-MARTÍN et al., 2012; SANTOS et al., 2015c), levando em consideração que o protocolo utilizado seja planejado corretamente (BARBOSA et al., 2013; DAL MAGRO et al., 2019), para que haja o fornecimento de condições ótimas para obtenção de uma boa estabilidade enzimática. O protocolo de imobilização utilizado deve ser estudado não apenas no quesito natureza do suporte como também, os grupos ativos da enzima e as condições inerentes às etapas de imobilização (GUIMARÃES et al., 2022; MULINARI et al., 2023; ZHU et al., 2022).

Dentre os diferentes protocolos de imobilização, as lipases podem ser imobilizadas em suportes sólidos pré-existentes, como é o caso dos suportes hidrofóbicos (ARANA-PEÑA et al., 2020c; BERNAL; ILLANES; WILSON, 2014; DU et al., 2009; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2011; MANOEL et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019), que tem por base o mecanismo de ativação interfacial (lipases apresentam uma predileção por estes, devido a sua função natural), como mencionado anteriormente. A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é um procedimento que permite a purificação e estabilização da enzima em uma única etapa (ABREU SILVEIRA et al., 2019; REMONATTO et al., 2018; TACIAS-PASCACIO et al., 2016; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017a), sendo por isso um procedimento de

amplo uso. Embora haja benefícios do uso de suportes hidrofóbicos, esse protocolo apresenta uma limitação relevante, pois pode ocorrer a liberação das moléculas de lipase do suporte devido a condições de temperatura, presença de solventes orgânicos ou produtos do próprio meio reacional (RUEDA et al., 2015a) (ORTIZ et al., 2019), que acabam inviabilizando o uso da enzima imobilizada.

Um suporte bastante utilizado em protocolos de imobilização é a agarose, que é totalmente inerte (caso não seja modificado) e atóxico, características positivas para imobilizar proteínas (BILAL et al., 2019a; DOS SANTOS et al., 2022; KHODADADI YAZDI et al., 2020; LOKHA et al., 2020c; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016b). A presença de diferentes grupos funcionais como modificadores da agarose, como o glioxil, vinilsulfona ou glutaraldeído (DA ROCHA et al., 2022b; MATEO et al., 2006; SIAR et al., 2017a, 2019, 2017b) vem como uma estratégia a fim de ocasionar o envolvimento de diferentes regiões da proteína bem como diferentes orientações entre a enzima e o suporte (GRAZU et al., 2006; SOUZA et al., 2022; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016b), estabilizando a lipase via ligação covalente multipontual, após a ativação interfacial, à camada de acila (ANTUNES LOPES et al., 2020; RODRIGUES et al., 2008). A reversibilidade do mecanismo de imobilização pode ser ajustada de acordo com os protocolos utilizados na construção do biocatalisador (BRAHAM et al., 2021c; DOS SANTOS et al., 2015d; MORELLON-STERLING et al., 2021a; RODRIGUES et al., 2008). Dessa forma, a utilização de suportes por ativação com grupos distintos, pode ser uma alternativa a fim de otimizar o processo de imobilização, proporcionando à enzima interação por diferentes fenômenos físicos ou químicos (BOLIVAR et al., 2009; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008) e solucionando as limitações mencionadas anteriormente.

A ativação do suporte de agarose com grupos químicos distintos possibilita a construção de um suporte heterofuncional para imobilização de enzimas. Para isso, o suporte com dois grupos distintos ocasionará, num primeiro momento, a imobilização da enzima por adsorção física. Posteriormente, é relatado que ocorre uma intensa ligação covalente entre a enzima e o suporte (ANTUNES LOPES et al., 2020; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2014; RODRIGUES et al., 2008), ou no caso da utilização do glutaraldeído como agente ativante, vê-se a obtenção de um suporte trocador de íons (CHEN et al., 2013; MALLIN; HÖHNE; BORNSCHEUER, 2014; MORELLON-STERLING et al., 2021a) . Um suporte com grupos vinilsulfona na sua constituição pode interagir com diferentes porções de aminoácidos de proteínas (como por exemplo resíduos de lisina, tirosina e histidina) do que

apenas entre grupos amino primários (observados para os grupos gioxil), (RIOS et al., 2019a; SIAR et al., 2019) mediante uma ligação de um ponto entre a enzima e o suporte (ARANA-PEÑA et al., 2019; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2014; SIAR et al., 2018b). O uso do suporte vinilsulfona requer um protocolo específico que é a etapa de bloqueio ao final da reação, no intuito de impedir a interação dos grupos vinilsulfona remanescentes com distintos nucleófilos da proteína, evitando assim reações indesejáveis entre a enzima e o suporte (DOS SANTOS et al., 2015b, 2015c, 2015d). O glutaraldeído também vem a ser um dos modificadores de suporte de interesse para imobilização enzimática, devido a sua versatilidade (ADRIANO et al., 2005; DE MELO et al., 2017; PINTO et al., 2020; RUIZ et al., 2001). A ativação do suporte com glutaraldeído é em geral realizada mediante uso de um suporte previamente modificado com grupos amino primários, fornecendo um suporte de natureza heterofuncional. Logo, a enzima é adsorvida no suporte por troca iônica num primeiro momento (através de grupos catiônicos presentes no suporte) e em seguida por interação covalente, entre grupos nucleófilos da enzima e grupos glutaraldeído presentes na superfície do suporte (BETANCOR et al., 2006a; GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2018; POON; WILSON; HEADLEY, 2014; SIAR et al., 2018a; ZAAK et al., 2017b). Em geral, a fim de preservar a estabilidade do glutaraldeído, o processo de imobilização ocorre em pH 7,0 sob baixa força iônica (DA ROCHA et al., 2022a).

Dentre as enzimas utilizadas na biocatálise, destaca-se a lipase A de *Candida antarctica* (CALA) que é constituída por 431 aminoácidos (45 kDa, pI = 7,5). É uma enzima que se destaca pela sua termoestabilidade frente a outras lipases, podendo ser aplicada em meios reacionais em temperaturas superiores a 90 °C (ROBLES-MACHUCA et al., 2019). A CALA apresenta uma estrutura com domínio α/β hidrolase que inclui uma tampa bem definida, sendo a ordem sequencial da tríade catalítica identificada pela Ser184, Asp334 e His366 (HØEGH et al., 1995; LILJEBBLAD et al., 2010). Devido às características relacionadas a sua estrutura, ainda que não seja habitualmente utilizada em sínteses orgânicas, como representado pela lipase B de *Candida antarctica*, a CALA apresenta uma predileção pela catalise de álcoois terciários volumosos estericamente impedidos (CAVALCANTE et al., 2022; HARI KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002) como também apresenta preferência por ácidos graxos de cadeia longa, quando em contato com substratos de ésteres de ácidos graxos ou triglicerídeos (CAVALCANTE et al., 2022; HARI KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002; JIANG et al., 2022; NETO; MILAGRE; MILAGRE, 2023).

Neste estudo, a lipase A de *Candida antarctica* foi imobilizada seguindo diferentes estratégias de imobilização nos suportes de octil-agarose, octil-vinilsulfona e aminogluteraldeído, por interação física e química distintas. As diferentes estratégias de imobilização tendem a produzir biocatalisadores cuja interação enzimática será por adsorção, troca iônica ou por ligação covalente (ALBUQUERQUE et al., 2016; SIAR et al., 2018a). As diferentes funcionalizações do suporte visam promover diferentes conformações estruturais na enzima que podem ocasionar variações tanto na seletividade quanto na atividade da enzima (REN et al., 2019b; RODRIGUES et al., 2013). A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (*FTIR*) foi utilizada para caracterizar a cobertura dos suportes e das estruturas imobilizadas, através do estudo da interação entre as moléculas presentes nesses. A composição química das amostras foi avaliada por meio da Fluorescência de Raios-X (FRX). Após análise das amostras por meio das técnicas de caracterização mencionadas anteriormente, os biocatalisadores obtidos no processo foram utilizados para a síntese do aroma butirato de geranila via rota enzimática. Dessa forma, a inovação desse estudo tem por destaque a utilização de diferentes estratégias de ativação e imobilização da lipase A de *Candida antarctica*, no intuito de proporcionar diferentes propriedades da enzima, a fim de aplicar esses biocatalisadores para fins de síntese enzimática.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Material

A lipase de *Candida antarctica* tipo A foi gentilmente cedida pela Novozymes (Madrid/ Espanha) na forma de solução aquosa com valor de 10,76 mg de proteína por ml e 0,131 U/mg. A enzima foi imobilizada em partículas de octil agarose, em octil-vinilsulfona e em aminogluteraldeído. Os reagentes glutaraldeído (25% (v/v)), etilenodiamina (EDA) e *p* - nitrofenilbutirato (*p* -NPB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O reagente borohidreto de sódio foi adquirido da Dinâmica e o periodato de sódio da Vetec. A divinilsulfona (DVS) foi adquirida da Thermo Fisher Scientific. Os grânulos Octil-Sepharose® CL-4B foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes eram produtos de grau analítico.

6.3.2 Métodos

6.3.2.1 Determinação da atividade hidrolítica da CALA

Para as análises de determinação das atividades das soluções enzimáticas, 50 µL de *p*-NPB, preparado anteriormente através da dissolução em 50 mM de acetonitrila, foram adicionados a uma cubeta contendo 2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0. Após o preparo do substrato, foram adicionados 50 µL (solução de solução de enzima livre ou suspensão de enzima imobilizada) à cubeta contendo o tampão a pH 7,0. A atividade da lipase foi realizada determinando o aumento da absorbância em 348 nm produzida pela hidrólise de *p*-NPB (ponto isosbético de *p*-NP, seu ϵ nessas condições é de $5150\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) em agitação magnética por 90 segundos e temperatura a 25 °C. A unidade de atividade enzimática (U) é definida a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de substrato hidrolisado por minuto, sendo quantidade de enzima livre ou imobilizada, nas condições do ensaio.

6.3.2.2 Preparação de grânulos de octil-vinilsulfona agarose

O preparo do suporte de agarose octilvinilsulfona foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por (ALBUQUERQUE et al., 2016) através de pequenas modificações. Para isso, 10 g de grânulos de octil-agarose foram adicionados a 200 mL de uma solução formada por tampão carbonato de sódio 0,333 M e 0,35 M de divinilsulfona em pH 11,5 (DOS SANTOS et al., 2015d). A solução foi agitada suavemente por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o suporte ativado foi filtrado a vácuo, lavado extensivamente com água destilada e armazenado a 4-6 °C.

6.3.2.3 Preparação do suporte de aminoglutaraldeído-agarose

Inicialmente foi realizado o preparo da agarose aminada, mediante protocolo desenvolvido por (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993). O suporte previamente aminado foi ativado com glutaraldeído através da incubação em solução de glutaraldeído a 10% em 200 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0 por 16 horas (DE MELO et al., 2017). Finalmente, o suporte ativado foi lavado com água destilada para retirada do excesso de glutaraldeído e armazenado em geladeira a 4-6 °C.

6.3.2.4 Imobilização da lipase CALA em grânulo de octil agarose

A lipase de *Candida antarctica* A foi imobilizada via ativação interfacial nas partículas de octil agarose. Para essa finalidade, a solução enzimática foi diluída em tampão fosfato de sódio 5 mM a pH 7,0 e 25 °C e posteriormente adicionado o suporte de octil agarose na proporção de 1 g de suporte para 10 mL de solução enzimática (carga de 4 mg/g de suporte). A imobilização foi realizada sob agitação mecânica por 2 horas e durante esse tempo foram medidas as atividades do sobrenadante, suspensão e enzima livre, usando para o ensaio *p*-NPB, como descrito anteriormente. Quando não foi observado atividade do sobrenadante na hidrólise do *p*-NPB, o biocatalisador foi filtrado, lavado com água destilada e armazenados em baixa temperatura (4 °C).

6.3.2.5 Imobilização da lipase CALA em grânulos de octil-vinilsulfona agarose

A fim de promover inicialmente a imobilização da enzima por ativação interfacial, a solução enzimática foi diluída em tampão acetato de sódio 5 mM a pH 5,0 à 25 °C e, em seguida, adicionou-se suporte de octil-vinilsulfona agarose na proporção de 1 g de suporte/10 mL de solução enzimática. A fim de averiguar esse processo, foi realizado a hidrólise do *p*-NPB para acompanhar a atividade do sobrenadante, suspensão e referência. Após esse primeiro momento, o biocatalisador foi lavado com água destilada, filtrado a vácuo e recuperado. No intuito de promover a formação da ligação covalente entre a enzima e o suporte, o biocatalisador foi ressuspenso em tampão carbonato de sódio 100 mM a pH 10,0 e 25 °C por 24 horas na mesma proporção. Posteriormente, 10 mL de etilenodiamina 2 M em pH 10,0 e 25 °C foi adicionada em 1 g de biocatalisador por 48 horas, para modificar as porções residuais de vinilsulfona. Ao final, os biocatalisadores foram lavados com água destilada, filtrados a vácuo e armazenados em geladeira a 4°C.

6.3.2.6 Imobilização da lipase CALA em grânulo de aminoglutaraldeído agarose

A solução enzimática de CALA foi adicionada ao suporte aminoglutaraldeído agarose na proporção de 1 g de suporte em 10 mL de solução de enzima. Em seguida, foi adicionado 5 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0 à 25°C por 2 horas. A imobilização foi seguida medindo-se a atividade de *p*-NPB do sobrenadante, suspensão e enzima livre. Após a imobilização, os biocatalisadores foram lavados com água, secos a vácuo e armazenados em geladeira.

6.3.2.7 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram analisados de acordo com a metodologia relatada em trabalhos anteriores (DE SOUZA et al., 2020). A atividade teórica (At_t), descrita na Eq. 1, foi estudada a partir do cálculo da quantidade de enzima ofertada ao suporte (g) e o rendimento de imobilização (SHELDON; VAN PELT, 2013). O rendimento de imobilização (%) foi definido como a porcentagem de atividade enzimática que está aderida no suporte ($At_i - At_f$) dividido pela atividade enzimática inicial, como mostra a Eq. 2 (DOS SANTOS et al., 2017)

$$At_t = RI \times At_{of} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$RI(\%) = \frac{(At_i - At_f)}{At_i} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

6.3.2.8 Caracterização estrutural dos suportes e dos biocatalisadores

6.3.2.8.1 Análise por Fluorescência de Raios-X (FRX)

A fim de avaliar a composição química e morfologia das amostras, foram realizadas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espectroscopia por Fluorescência de Raios-X (FRX). O SEM foi realizado no microscópio QUANTA 450 FEG, as amostras primeiramente foram metalizadas em metalizadora a vácuo com filme fino de ouro e posteriormente analisadas no microscópio com MAG de 5.0 kx. O FRX foi realizado no equipamento SHIMADZU modelo EDX-7000 equipado com um tubo de ródio, aplicando uma potência de 4 kV nas amostras de pó.

6.3.2.8.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Spectrophotometer, modelo Cary 50, com uma faixa de número de onda entre 4000 e 400 cm⁻¹. As amostras foram tratadas inicialmente secas para retirada do

excesso de água e dispersas em KBr na proporção de 1:10. Posteriormente, as pastilhas foram moldadas com prensa hidráulica.

6.3.2.9 Síntese do Aroma Butirato de Geranila

Para verificar a atividade enzimática da CALA com diferentes tipos de suportes nas reações de esterificação, foram medidas as conversões de geraniol em butirato de geranila, de acordo com observado no Esquema 6.1. A primeira análise foi realizada tanto com a enzima livre bem como um meio ausente de enzima (controle), realizados em triplicata. As reações propostas para os biocatalisadores imobilizados nos três suportes distintos (octil agarose, octil-vinilsulfona e aminoglutaraldeído) também foram realizados em triplicata. Foi utilizada uma relação ácido-álcool de 1:5, com ácido butírico como agente esterificante e geraniol como substrato. O volume da reação, totalizando 1 mL, foi adicionado a um Erlenmeyer, tampado e lacrado. A adição de 165 µL da enzima CALA (15% do meio reacional) foi feita na reação 1; 1,1 mg de octil-agarose-CALA, octil-vinil-sulfona-CALA e octil-amino-glutaraldeído-CALA biocatalisador foi adicionado às suas respectivas reações, iniciando a esterificação dos sistemas 2 a 4. Triplicatas de cada sistema de reação foram submetidas a condições experimentais fixas: 200 rpm, 50 °C por 360 minutos, como descrito na Tabela 6.1

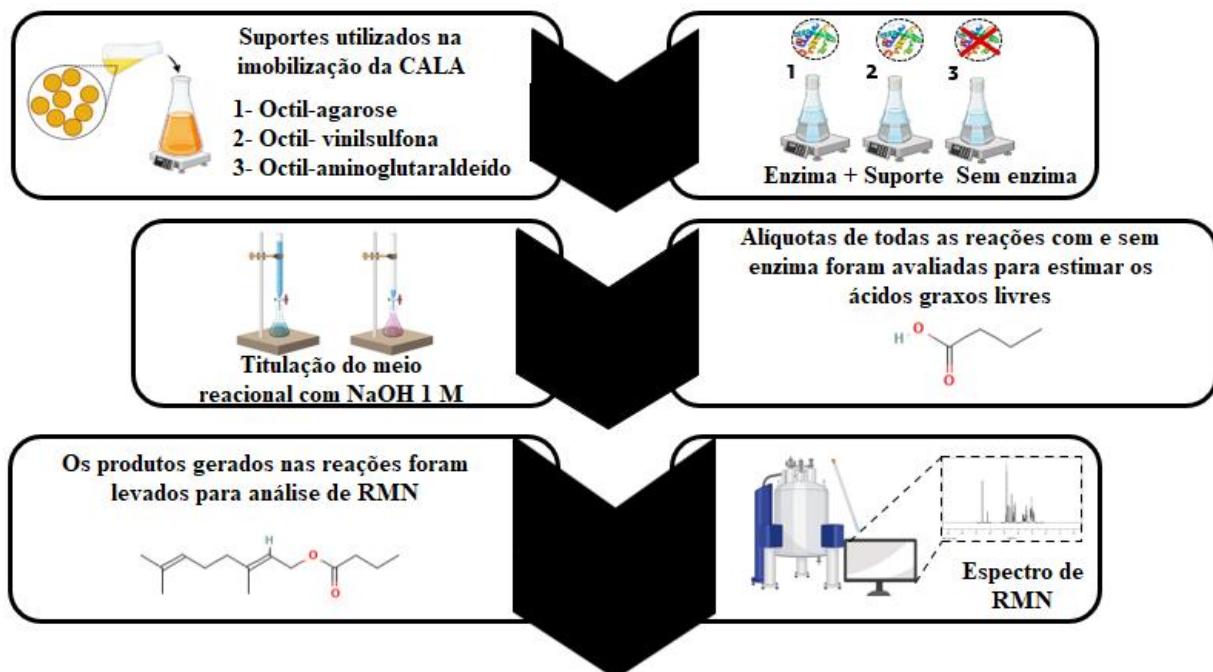
Tabela 6.1 Parâmetros relacionados aos sistemas de composição para as sínteses, submetidas as condições experimentais fixas de 200 rpm, a 50 °C por 360 minutos.

Sistema 1	0,1mL de ácido butírico + 1mL de geraniol + CALA livre.
Sistema 2	0,1mL de ácido butírico + 1 mL de geraniol + octil-CALA
Sistema 3	0,1mL de ácido butírico + 1 mL de geraniol + octil-VS-CALA
Sistema 4	0,1mL de ácido butírico + 1 mL de geraniol + aminoglutaraldeído-CALA
Branco	0,1mL de ácido butírico + 1 mL de geraniol

Fonte: Elaborada pela autora.

Simultaneamente, a reação foi realizada com uma espécie de controle de reação, onde nenhuma enzima foi adicionada, para que, nas mesmas condições, pudesse ser usada como padrão (LISTUNOV et al., 2015)

Esquema 6.1. Esquema das etapas adotadas no procedimento experimental e caracterização dos produtos da reação.



Fonte: Elaborada pela autora.

6.3.2.9.1 Estimativa do grau de síntese

Alíquotas de 100 µL foram retiradas de cada sistema de reação e do padrão de reação sem a enzima. Adicionaram-se 5 mL de etanol neutralizado e a titulação dos ácidos graxos livres foi realizada com NaOH 0,1 M, utilizando a fenolftaleína como indicador da reação. A estimativa do índice de acidez foi feita usando a Equação (2) como parâmetro.

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{At_i - At_f}{At_i} \times 100$$

IA_i corresponde ao índice de acidez inicial, ou seja, a quantidade de AGL adicionada na reação e IA_f ao índice de acidez final, equivalente ao que resta de AGL em solução, não utilizado pela enzima.

6.3.2.9.2 Caracterização dos produtos da reação

Os espectros unidimensionais da Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio (¹H

RMN) e do Carbono (^{13}C RMN) foram obtidos em um espectrômetro Bruker, modelo Advance DRX-300, pertencente ao Centro Nordeste de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear, localizado no Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). O experimento foi realizado na frequência do hidrogênio em 300 MHz e na frequência do carbono em 75 MHz. O solvente utilizado para dissolver as amostras foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e as mesmas foram analisadas em tubos de 5 mm.

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Determinação dos Parâmetros de Imobilização

Conforme descrito anteriormente, os derivados foram preparados utilizando diferentes estratégias de imobilização. Para o biocatalisador de octil-CALA, a enzima interage com os grupamentos do suporte por ativação interfacial via adsorção hidrofóbica.(RUEDA et al., 2016c). Para o suporte de octil-VS, preparado mediante ativação com o reagente divinilsulfona, a imobilização tem por objetivo alcançar uma intensa ligação covalente multiponto entre os nucleófilos enzimáticos e grupamentos do suporte, embora possa ocorrer num primeiro momento, um processo de adsorção. Ainda para esse biocatalisador, caso ocorra uma interação multipontual enzima-suporte, pode-se obter uma rigidificação estrutural, que influenciará na estabilidade da composição. (DOS SANTOS et al., 2015b, 2015d) Por fim, o suporte de aminoglutaraldeído tem por característica ser um trocador iônico, embora também ocorra interação entre as espécies participantes (enzima-suporte) a ligação covalente. (ADRIANO et al., 2005; DE MELO et al., 2017)

Tabela 6.2 Atividades dos diferentes biocatalisadores da lipase de *candida antarctica* A (CALA) na hidrólise de *p* -NPB 1 mM em pH 7,0 à 25 °C.

Biocatalisador	A_{toff} (U/g)	A_{D} (U/g)	A_{T} (U/g)	$A_{\text{tr}} (\%)$	$R_{\text{I}} (\%)$
Octil-CALA	263	42,28	218,47	19,35	83
Octil-VS-CALA	275,6	39,35	260,38	15,11	94,48
Aminoglutaraldeído-CALA	179	21,75	163,39	13,31	91,28

Fonte: Elaborada pela autora.

Através dos dados mencionados na Tabela 6.2 vê-se que não houve diferenças

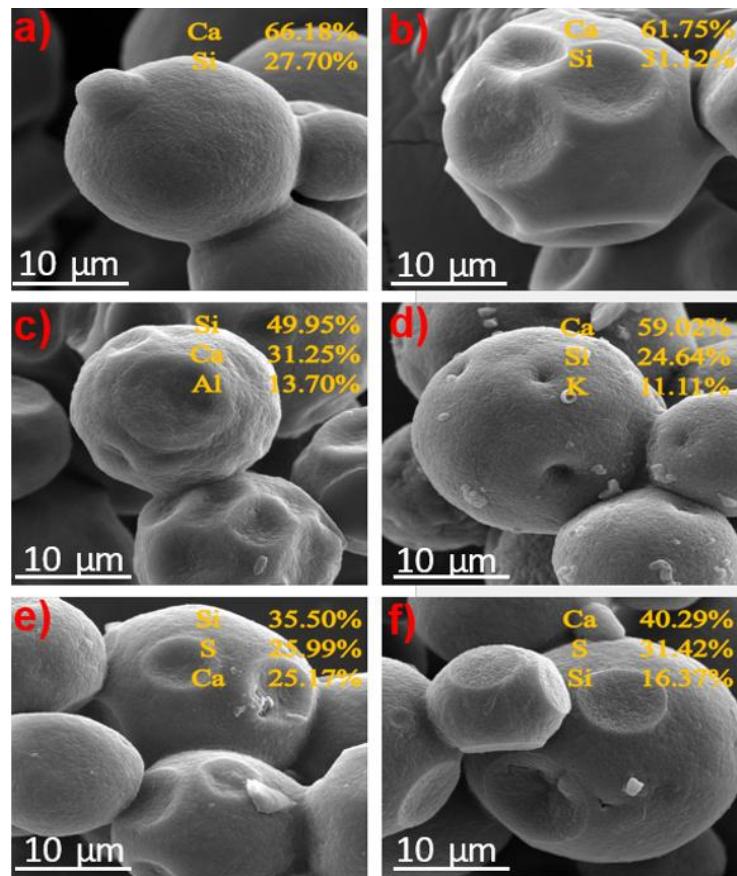
significativas nos rendimentos de imobilização entre os três biocatalisadores, embora tenha apresentado um melhor resultado para o octil-VS (aproximadamente 95%). Isso sugere que a ligação covalente assim como a etapa de bloqueio, inerente ao preparo do biocatalisador, produziu uma estrutura mais ativa do que o octil-CALA onde a enzima interage por uma interação mais fraca. Embora o uso das diferentes estratégias tenha promovido a imobilização da enzima, as atividades recuperadas foram baixas, principalmente utilizando o aminoglutaraldeído. Uma das possibilidades para esses dados deve-se à dessorção enzimática ocorrida durante o processo de lavagem do derivado (caso não tenha ocorrida uma imobilização realmente eficaz), ou a liberação da enzima devido ao braço espaçador mais longo, que reduz a mobilidade na estrutura da enzima. (SIAR et al., 2018a)

6.4.2 Análise por Fluorescência de Raios-X (FRX)

Micrografias de varredura (SEM) de octil, octil-CALA, octil-vinilsulfona, octil-vinilsulfona-CALA, octil-aminoglutaraldeído e octil-aminoglutaraldeído-CALA e mapas de espectroscopia de fluorescência (XRF) (inserção) são mostrados na Figura 6.1 (a-f). A morfologia da superfície da octil-agarose apresenta-se na forma de microesferas, que se formam devido a sua gelificação que ocorre quando a cadeia de 1-agarose forma uma dupla hélice e a cadeia de 2-agarose se auto-organiza formando agregados físicos denominados conexões microcristalinas, estas conexões interagem com as ligações de hidrogênio e formam a estrutura 3D da agarose (XIAO et al., 2022).

Todas as imagens mostram a estrutura de octil-agarose como predominante. Nenhuma alteração na morfologia dos suportes (octil-agarose, octil-aminoglutaraldeído e octil-vinilsulfona) foi observada após a imobilização. O processo de imobilização geralmente não altera as características morfológicas do suporte, e a visualização da enzima é impossível devido à escala de análise SEM (SILVA et al., 2023). Porém, é possível notar diferenças sutis entre os três suportes, onde entre octil e octil-aminoglutaraldeído é possível notar pequenas diferenças na rugosidade, e entre octil e octil-vinilsulfona a inclusão de pequenos agregados. De qualquer forma, a estrutura mostrou-se coerente conforme apresentado na literatura (JIANG et al., 2023).

Figura 6.1. Micrografias SEM e mapas XRF (insert). a) octil b) octil-CALA c) octil-VS d) octil-VS-CALA e) octil-aminoglutaraldeído e f) octil-aminoglutaraldeído-CALA.



Fonte: Elaborada pela autora.

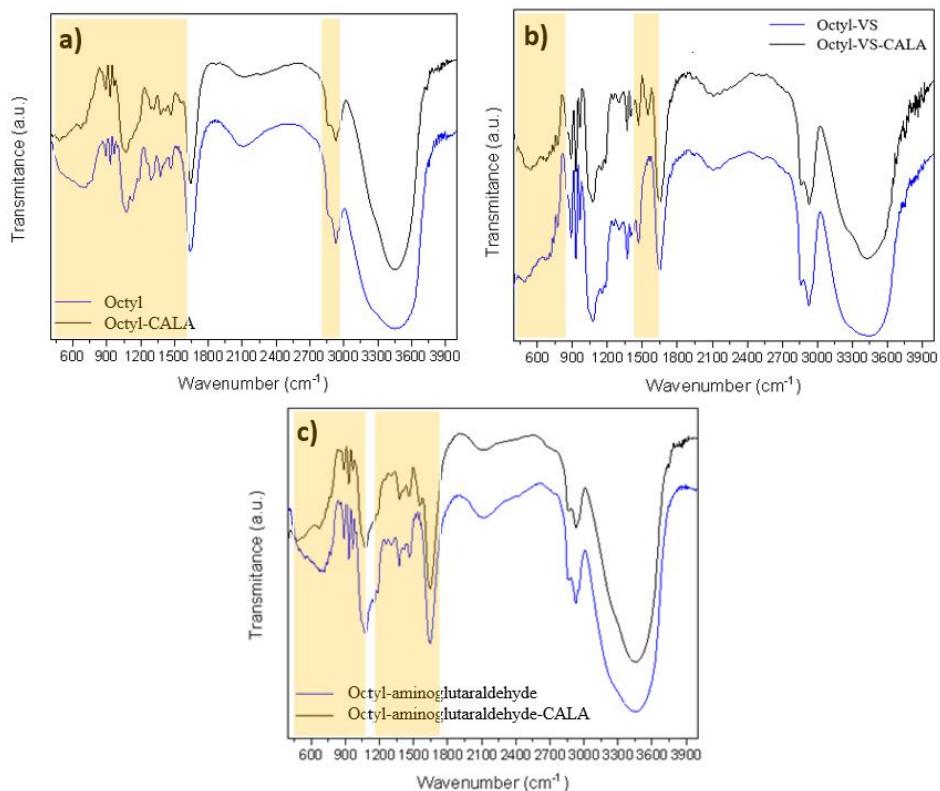
Os mapas de espectroscopia de fluorescência (XRF) entre a Figura 6.1 (a) e a Figura 6.1 (b) não apresentaram alterações relevantes. A Figura 6.1 (c) possui maior composição de Si, o que pode estar relacionado à incorporação de vinilsulfona e Figura 6.1 (d) possui maior composição de Ca, que é um cofator enzimático, o que pode gerar a hipótese de reação enzimática com o suporte. Na Figura 6.1 (e) observa-se uma menor quantidade de Si e aumento crescente de S, não permitindo conclusões sobre o aminoglutaraldeído.

6.4.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 6.2 mostra os espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos suportes octil, octil-vinilsulfona e octil-aminoglutaraldeído e dos biocatalisadores formados por esses suportes. Todos os FTIR mantiveram as bandas padrões características da octil agarose, com banda entre 1500 e 1600 cm⁻¹ atribuído a vibrações de C=C, com uma banda

entre 2800 e 3000 cm^{-1} atribuído a -CH, e uma banda de adsorção larga entre 3300 e 3600 cm^{-1} correspondente ao modo de alongamento de -OH (LOKHA et al., 2020d; MOHAMAD HANAPI et al., 2017).

Figura 6.2. Espectros FTIR. a) Octil (preto) e octil-CALA (azul). b) Octil-VS (preto) e octil-VS-CALA (azul). c) Octil-aminoglutaraldeido (preto) e octil-aminoglutaraldeido-CALA (azul).



Fonte: Elaborada pela autora

Algumas pequenas modificações dos padrões FTIR podem ser observados após a modificações da octil agarose com a vinilsulfona e com o aminoglutaraldeido. Entre a octil e a octil-VS, e a octil e octil-aminoglutaraldeido podemos observar padrões diferentes entre as bandas de 600 a 1500 cm^{-1} onde podemos relacionar com a ativação da octil tanto pelo vinilsulfona quanto pelo glutaraldeido (ARANA-PEÑA et al., 2020d; RIOS et al., 2019b). Na imobilizaçao da CALA pelos suportes, a Figura 6.2 (a) mostra uma pequena alteração das bandas entre 400 a 1500 cm^{-1} e entre 2900 e 3000 cm^{-1} podendo gerar uma hipótese de imobilizaçao da CALA pela octil. A Figura 6.2 (b) mostra alterações entre as bandas de 400 a 900 cm^{-1} e uma modificação mais aparente entre a banda de 1500 cm^{-1} . A Figura 6.2 (c) mostra alterações entre as bandas de 400 a 1100 cm^{-1} e entre 1200 e 1700 cm^{-1} . Nos três suportes podemos observar que após a imobilizaçao as bandas mais susceptíveis a apresentar

modificações estão entre 400 e 1500 cm⁻¹.

6.4.4 Esterificação dos biocatalisadores de CALA

A reação de esterificação foi baseada na análise da taxa de conversão (Eq. 2), mediante a titulação do ácido butírico com o hidróxido de sódio, como mencionado na seção anterior. O grau de conversão dos ésteres formados é realizado de forma indireta, pois a titulação é vista não diretamente pela presença do butirato de geranila formado, mas sim, pela quantidade de ácido butírico do meio reacional.

Tabela 6.3. Conversões dos diferentes sistemas reacionais no aroma butirato de geranila.

Reação	Suporte	Conversão (%)
Sistema 1	Enzima livre	63,16
Sistema 2	Octil agarose	54,15
Sistema 3	Octil-VS	48,60
Sistema 4	Aminoglutaraldeído	71,05

Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 6.3 relaciona as taxas de conversão obtidas através da utilização dos biocatalisadores de CALA produzidos via protocolos distintos de imobilização, tendo a enzima livre (ausente de suporte) utilizada como um parâmetro de referência. As diferentes formas de imobilização possivelmente provocam mudanças estruturais na enzima quando em contato com os grupamentos do substrato, aferindo assim valores de conversão dispares entre os suportes. Vê-se que o suporte aminoglutaraldeído apresentou uma maior taxa de conversão (71%), sugerindo que os grupos funcionais deste possa ter promovido uma maior estabilidade da enzima, para que essa pudesse interagir com mais facilidade com os ligantes do substrato.

Embora o biocatalisador de aminoglutaraldeído tenha proporcionado um melhor valor de conversão, o valor da taxa inferior a 100% pode estar relacionado a presença da água, que vem a ser um subproduto do meio reacional. A água pode promover modificações não apenas na conformação da enzima, afetando diretamente na atividade catalítica dessa, como também

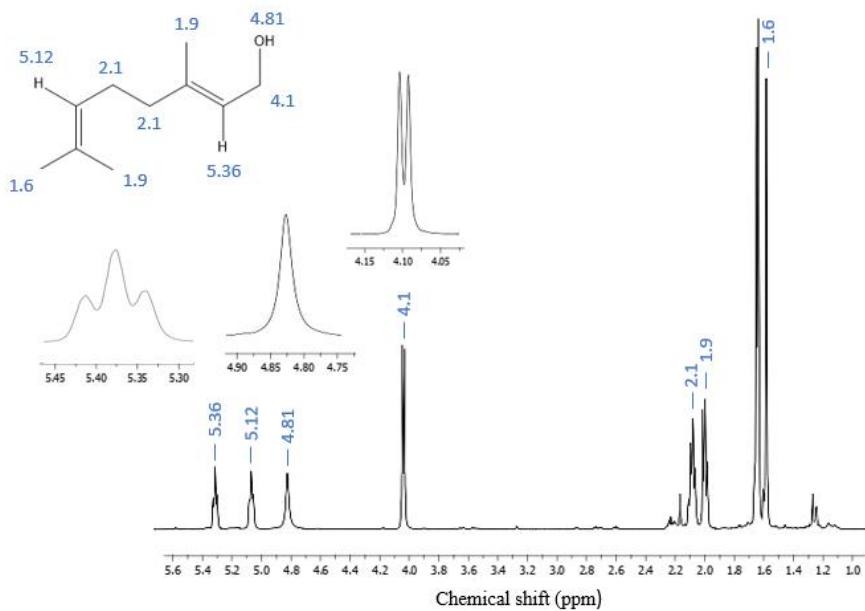
pode interferir no equilíbrio da reação de esterificação (KANWAR et al., 2008).

6.4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio (1H RMN) e do Carbono (^{13}C RMN)

6.4.4.1.1 RMN do substrato

O geraniol foi o álcool utilizado como substrato na biocatálise, apresentando uma única hidroxila em sua estrutura química. A Figura 6.3 mostra um duploto em δ 4,1 referente ao hidrogênio ligado diretamente ao oxigênio hidroxila, um pico característico para álcoois, pois hidrogênios com esse perfil espectroscópico possuem deslocamentos químicos dentro dessa faixa. O singlet em δ 4,8 refere-se ao hidrogênio da própria hidroxila, onde seu desaparecimento é evidência da conversão de álcoois em ésteres. O triploto δ 5,36 está associado ao hidrogênio vinílico. O restante dos picos entre δ 1,6 e δ 2,1 compreendem os hidrogênios referentes à estrutura carbônica do geraniol, considerando sua integração e multiplicidade.

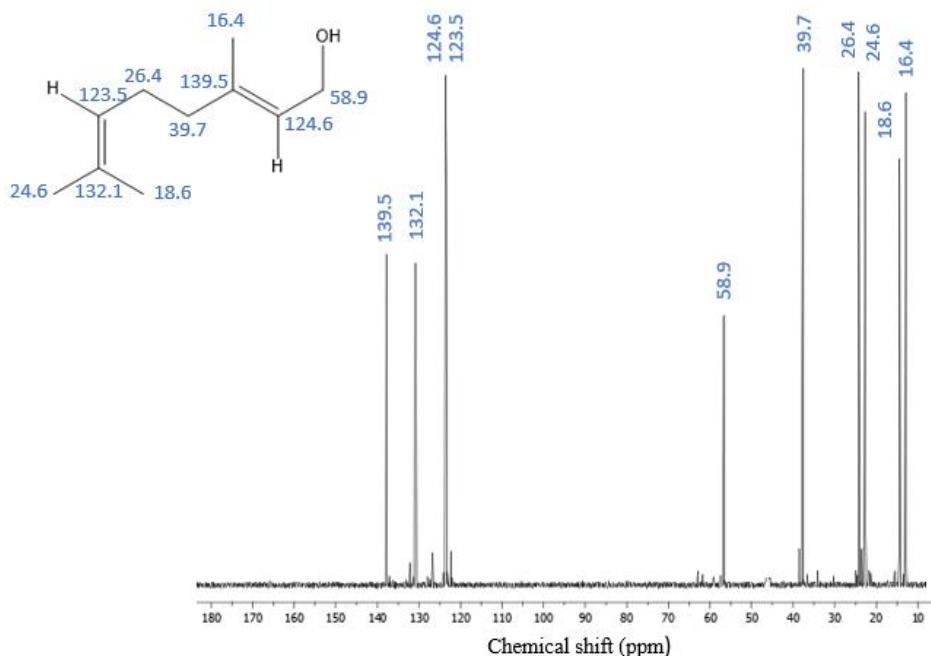
Figura 6.3 Espectro 1H do geraniol obtido no Espectrômetro Brunker na frequência de 500 MHz, destacando-se os principais picos referentes à estrutura do substrato álcool.



Fonte: Elaborada pela autora

Na Figura 6.4 é possível observar o espectro do ^{13}C para o geraniol, onde estão destacados todos os deslocamentos químicos referentes aos carbonos deste substrato. O pico em δ 58,9 é o maior indicador do álcool primário, onde a região desta banda indica o carbono ligado à hidroxila.

Figura 6.4 Espectro ^{13}C para geraniol obtido no Espectrômetro Brunker com frequência de 75 MHz, alinhando os picos dos carbonos da estrutura aos seus respectivos deslocamentos químicos.



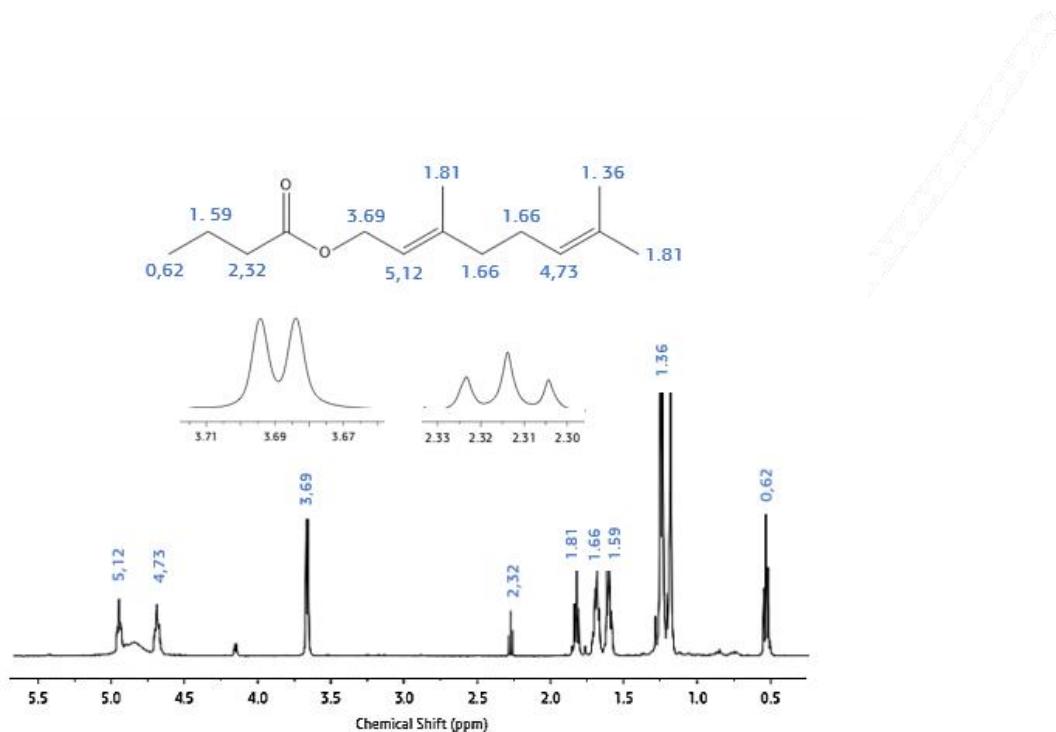
Fonte: Elaborada pela autora

6.4.4.1.2 RMN do produto da reação

O espectro de ^1H RMN do butirato de geranila mostrou que houve conversão do substrato catalisada pela enzima. A Figura 6.5 mostra picos característicos para os hidrogênios da estrutura éster, os sinais próximos a δ 3,69, representados pela expansão, estão relacionados aos hidrogênios metíleno ligados diretamente ao oxigênio do éster. Em relação à sua integração, os picos δ 4,73 e δ 5,12 são originários do acoplamento com os hidrogênios ligados ao carbono sp^2 . Os picos próximos em δ 2,32 mostram um trigêmeo, representado pela expansão, onde o deslocamento químico é esperado para os hidrogênios metíleno ligados ao carbono carbonílico do éster. Os demais picos podem ser comparados por um perfil

espectroscópico dos acoplamentos à estrutura, demonstrando seus deslocamentos químicos favoráveis à caracterização da estrutura.

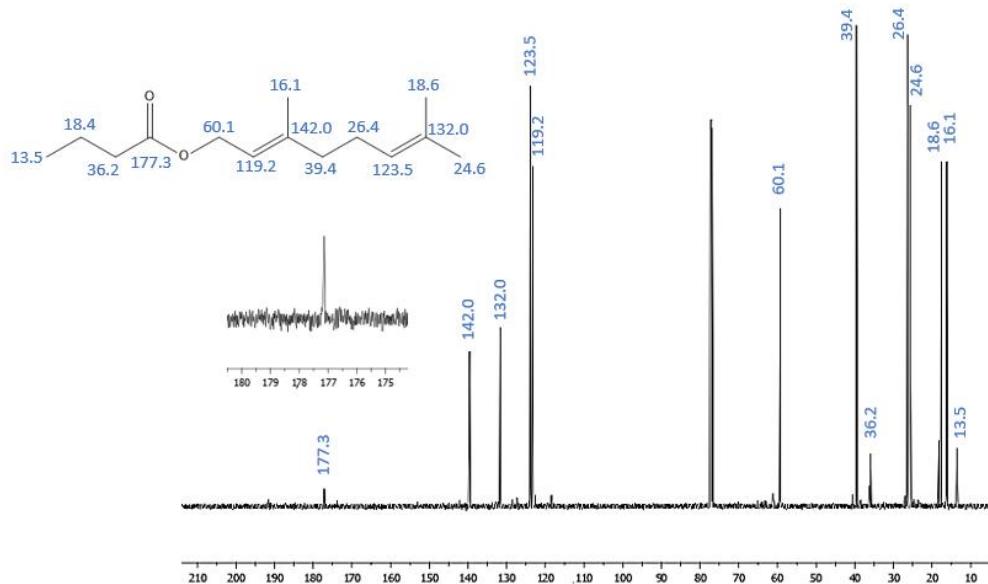
Figura 6.5 Espectro de ^1H RMN para butirato de geranila.



Fonte: Elaborada pela autora

O espectro de RMN ^{13}C foi utilizado para indicar a conversão do álcool em éster pelo aparecimento do carbono carbonílico do éster, que possui sinal próximo a 175 ppm. Um pico de baixa intensidade nessa região de deslocamento químico indica que houve uma conversão, pois nos álcoois, o carbono ligado à hidroxila tem picos em outras regiões do espectro de ^{13}C NMR. Na Figura 6.6 é possível identificar o perfil esperado para o butirato de geranila, onde o pico característico aparece em 177 ppm.

Figura 6.6 Espectro de RMN ^{13}C para butirato de geranila, indicando o pico principal referente à conversão do álcool no éster.



Fonte: Elaborada pela autora

6.5 Conclusão

Os resultados obtidos nessa pesquisa constataram que os diferentes protocolos de imobilização enzimática promoveram distinções estruturais e morfológicas entre os biocatalisadores de CALA, sendo confirmados pelos métodos de caracterização utilizados. As diferentes ativações do suporte, forneceram modificações nas interações químicas e físicas influenciando nos resultados de atividade catalítica, e consequentemente nas taxas de conversão para produção do aroma butirato de geranila. A produção do aroma mediante a síntese enzimática promovida pela lipase A de *Candida antarctica* vem a ser uma alternativa ecológica e prática aos métodos químicos, sendo uma ferramenta importante para aplicação industrial e com potencial em larga escala.

CONCLUSÃO

A rápida imobilização da enzima penicilina G acilase (PGA) em agarose-VS, promovida através do uso de alta força iônica, possivelmente teve início através da adsorção hidrofóbica, sendo seguida por ligação covalente entre a enzima e o suporte. O uso de sulfato de sódio 1 mol/L utilizado durante a etapa de imobilização promoveu a rápida interação da enzima com o suporte. As variáveis relacionadas ao estudo do pH de imobilização, efeitos de incubação e bloqueio forneceu biocatalisadores mais estáveis de PGA, inclusive quando comparado ao biocatalisador glioxil-agarose- PGA.

O processo de imobilização da PGA ocorreu de forma rápida e intensa quando ela foi imobilizada num suporte de agarose-MANAE-VS. Esse suporte foi formado através da cooperação de dois outros distintos que, em separado, não efetivaram a imobilização da enzima penicilina G acilase. Como visto anteriormente, as etapas de estudo do pH de imobilização, efeitos da incubação e os agentes bloqueantes foram decisivos para a manutenção da estabilidade do biocatalisador.

Os dados evidenciados no estudo da estabilidade das diferentes lipases em condições de estresse, mostraram que não foi possível estabelecer uma ordem de biocatalisador estável para cada enzima, haja vista as condições operacionais envolvidas na construção dos diferentes biocatalisadores, como é o caso da estabilidade enzimática e atividade ótima, não apresentarem uma relação direta entre si. A natureza do substrato, o suporte utilizado, bem como a temperatura ótima são fatores que se correlacionam para obtenção das diferentes estabilidades enzimáticas.

O estudo da síntese do aroma butirato de geranila promovida com o uso de biocatalisadores de *Candida antarctica* A, forneceu diferentes resultados de conversão, sugerindo que os protocolos de imobilização afetam não apenas o quesito atividade enzimática, como também a eficiência na obtenção do produto. O suporte de aminoglutaraldeído forneceu o melhor resultado de conversão (71%), sugerindo que a mobilidade da enzima com o suporte (provavelmente ao braço espaçador oriundo do glutaraldeído) facilitou a interação do sítio ativo com os ligantes do substrato. Por fim, os resultados obtidos pela Ressonância Magnética Nuclear constataram, através da representação do pico em 177 ppm, que houve a síntese do aroma butirato de geranila.

REFERÊNCIAS

- ABIAN, O. et al. Stabilization of Immobilized Enzymes Against Water-Soluble Organic Cosolvents and Generation of Hyper-Hydrophilic Micro-Environments Surrounding Enzyme Molecules. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 19, n. 5–6, p. 489–503, 11 jan. 2001.
- ABIAN, O. et al. Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p. 295–303, dez. 2002.
- ABIAN, O. et al. Improving the Industrial Production of 6-APA: Enzymatic Hydrolysis of Penicillin G in the Presence of Organic Solvents. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 6, p. 1639–1642, 5 dez. 2003.
- ABIAN, O. et al. Stabilization of Penicillin G Acylase from Escherichia coli : Site-Directed Mutagenesis of the Protein Surface To Increase Multipoint Covalent Attachment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1249–1251, fev. 2004.
- ABREU SILVEIRA, E. et al. Biocatalyst engineering of Thermomyces Lanuginosus lipase adsorbed on hydrophobic supports: Modulation of enzyme properties for ethanolysis of oil in solvent-free systems. **Journal of Biotechnology**, v. 289, p. 126–134, jan. 2019.
- ADDORISIO, V. et al. Oxidation of phenyl compounds using strongly stable immobilized-stabilized laccase from Trametes versicolor. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1174–1180, ago. 2013.
- ADRIANO, W. S. et al. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2005.
- AGARWAL, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, n. 3, p. 233–271, jun. 2007.
- AHAMMAD, S. Z.; GOMES, J.; SREEKRISHNAN, T. R. Improvement of enantioselectivity and stability of *Klebsiella oxytoca* hydrolase immobilized on Eupergrit C 250L. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. May, p. 1163–1169, 2008.
- AIT BRAHAM, S. et al. Cooperativity of covalent attachment and ion exchange on alcalase immobilization using glutaraldehyde chemistry: Enzyme stabilization and improved proteolytic activity. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 2, p. e2768, 27 mar. 2019.
- AKBARZADEH, A. et al. Disulfide bonds elimination of endoglucanase II from *Trichoderma reesei* by site-directed mutagenesis to improve enzyme activity and thermal stability: An experimental and theoretical approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1572–1580, dez. 2018.
- ALBUQUERQUE, T. L. D. et al. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 865–874, jul. 2016.

ALCALDE, M. et al. Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor. **Journal of Biotechnology**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jbiotec>.

ALCÁNTARA, A. R. et al. Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry. **ChemSusChem**, v. 15, n. 9, 6 maio 2022.

ALONSO, S. et al. Genetically engineered proteins with two active sites for enhanced biocatalysis and synergistic chemo- and biocatalysis. **Nature Catalysis**, v. 3, n. 3, p. 319–328, 16 mar. 2020.

ALVARO, G. et al. Immobilization-stabilization of Penicillin G acylase from *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 181–195, nov. 1990.

ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One Biocatalyst—Many Applications: The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 16, n. 3, p. 181–204, 11 jan. 1998.

ANTUNES LOPES, L. et al. Glyoxyl-activated agarose as support for covalently link novo-pro d: Biocatalysts performance in the hydrolysis of casein. **Catalysts**, 2020.

ARANA-PEÑA, S. et al. New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: Strategies to reuse the most stable lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

ARANA-PEÑA, S. et al. Use of polyethylenimine to produce immobilized lipase multilayers biocatalysts with very high volumetric activity using octyl-agarose beads: Avoiding enzyme release during multilayer production. **Enzyme and Microbial Technology**, 2020a.

ARANA-PEÑA, S. et al. 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**, v. 8, 28 fev. 2020b.

ARANA-PEÑA, S. et al. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. **Catalysis Today**, abr. 2020c.

ARANA-PEÑA, S. et al. Use of polyethylenimine to produce immobilized lipase multilayers biocatalysts with very high volumetric activity using octyl-agarose beads: Avoiding enzyme release during multilayer production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 137, p. 109535, 1 jun. 2020d.

ARANA-PEÑA, S. et al. Multi-Combilipases: Co-Immobilizing Lipases with Very Different Stabilities Combining Immobilization via Interfacial Activation and Ion Exchange. The Reuse of the Most Stable Co-Immobilized Enzymes after Inactivation of the Least Stable Ones. **Catalysts**, v. 10, n. 10, p. 1207, 19 out. 2020e.

ARANA-PEÑA, S. et al. Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers'

choice...or not? **Biotechnology Advances**, v. 51, p. 107584, nov. 2021.

ARANA-PEÑA, S. et al. The combination of covalent and ionic exchange immobilizations enables the coimmobilization on vinyl sulfone activated supports and the reuse of the most stable immobilized enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 199, p. 51–60, fev. 2022a.

ARANA-PEÑA, S. et al. The combination of covalent and ionic exchange immobilizations enables the coimmobilization on vinyl sulfone activated supports and the reuse of the most stable immobilized enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 199, p. 51–60, fev. 2022b.

ARANA-PEÑA, S. et al. The combination of covalent and ionic exchange immobilizations enables the coimmobilization on vinyl sulfone activated supports and the reuse of the most stable immobilized enzyme. **International journal of biological macromolecules**, v. 199, p. 51–60, 28 fev. 2022c.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization on octyl agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida antarctica* (Novocor ADL): Comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, p. e2735, jan. 2019.

ARROYO, M. et al. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 507–514, jan. 2003.

BAI, X. et al. Immobilization of α -galactosidase in polyvinyl alcohol-chitosan-glycidyl methacrylate hydrogels based on directional freezing-assisted salting-out strategy for hydrolysis of RFOs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, 1 jul. 2023.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9–14, jan. 2010.

BALDARO, E. et al. Pen G acylase catalyzed resolution of phenylacetate esters of secondary alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 4, n. 5, p. 1031–1034, maio 1993.

BALE OENICK, M. D. et al. Antigen-binding activity of antibodies immobilized on styrene copolymer beads. **Annales de biologie clinique**, v. 48, n. 9, p. 651–4, 1990.

BARBOSA, O. et al. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 12 ago. 2013.

BARBOSA, O. et al. **Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization**. **RSC Advances**, 2014.

BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. . set. 2015, p. 435–456.

BASSO, A. et al. d-Phenylglycine and d-4-hydroxyphenylglycine methyl esters via penicillin

G acylase catalysed resolution in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 11, n. 8, p. 1789–1796, maio 2000.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, dez. 2019.

BECARO, A. A. et al. Immobilization and stabilization of D-hydantoinase from Vigna angularis and its use in the production of N-carbamoyl-D-phenylglycine. Improvement of the reaction yield by allowing chemical racemization of the substrate. **Process Biochemistry**, 2020.

BENÍTEZ-MATEOS, A. I. et al. Design of the Enzyme-Carrier Interface to Overcome the O₂ and NADH Mass Transfer Limitations of an Immobilized Flavin Oxidase. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 50, p. 56027–56038, 2020.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, v. 14, n. 12, p. 1069–1087, 1998.

BERNAL, C.; ILLANES, A.; WILSON, L. Heterofunctional Hydrophilic-Hydrophobic Porous Silica as Support for Multipoint Covalent Immobilization of Lipases: Application to Lactulose Palmitate Synthesis. **Langmuir**, v. 30, n. 12, p. 3557–3566, 21 abr. 2014.

BERNAL, C.; RODRÍGUEZ, K.; MARTÍNEZ, R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 5, p. 1470–1480, set. 2018.

BETANCOR, L. et al. Glutaraldehyde in Protein Immobilization. Em: [s.l: s.n.]. p. 57–64.

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

BEZERRA, R. M. et al. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 104–115, 2017.

BIJOY, G. et al. Enzyme immobilization on biomass-derived carbon materials as a sustainable approach towards environmental applications. **Chemosphere**, v. 307, p. 135759, nov. 2022.

BILAL, M. et al. Agarose-chitosan hydrogel-immobilized horseradish peroxidase with sustainable bio-catalytic and dye degradation properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019a.

BILAL, M. et al. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202–219, 17 fev. 2019b.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. **Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization**. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

BINAEIAN, E.; BABAEE ZADVARZI, S.; YUAN, D. Anionic dye uptake via composite using chitosan-polyacrylamide hydrogel as matrix containing TiO₂ nanoparticles; comprehensive adsorption studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

BŁASZCZYK, J.; KIEŁBASIŃSKI, P. Quarter of a Century after: A Glimpse at the Conformation and Mechanism of *Candida antarctica* Lipase B. **Crystals**, v. 10, n. 5, p. 404, 16 maio 2020.

BOLIVAR, J. M. et al. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 477–483, dez. 2009.

BOLIVAR, J. M.; EISL, I.; NIDETZKY, B. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. **Catalysis Today**, v. 259, p. 66–80, jan. 2016.

BOLIVAR, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F. Characterization and evaluation of immobilized enzymes for applications in flow reactors. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 25, p. 100349, out. 2020.

BOLIVAR, J. M.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 51, n. 15, p. 6251–6290, 2022.

BOMMARIUS, A. S.; PAYE, M. F. Stabilizing biocatalysts. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6534, 2013.

BONAZZA, H. L. et al. Operational and Thermal Stability Analysis of *Thermomyces lanuginosus* Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2018.

BORTONE, N.; FIDALEO, M.; MORESI, M. Internal and external mass transfer limitations on the activity of immobilised acid urease derivatives differing in enzyme loading. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 22–33, jan. 2014.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation**. **Process Biochemistry**, 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976a.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976b.

BRAHAM, S. A. et al. Effect of concentrated salts solutions on the stability of immobilized enzymes: Influence of inactivation conditions and immobilization protocol. **Molecules**, v. 26,

n. 4, p. 968, fev. 2021a.

BRAHAM, S. A. et al. Positive effect of glycerol on the stability of immobilized enzymes: Is it a universal fact? **Process Biochemistry**, v. 102, p. 108–121, mar. 2021b.

BRAHAM, S. A. et al. Effect of Tris Buffer in the Intensity of the Multipoint Covalent Immobilization of Enzymes in Glyoxyl-Agarose Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 9, p. 2843–2857, 21 set. 2021c.

BRUGGINK, A.; ROOS, E. C.; DE VROOM, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. **Organic Process Research & Development**, v. 2, n. 2, p. 128–133, 1 mar. 1998.

BRYJAK, J.; LIESIENE, J.; KOLARZ, B. N. Application and properties of butyl acrylate/pentaerythrite triacrylate copolymers and cellulose-based Granocel as carriers for trypsin immobilization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 1, p. 66–74, jan. 2008.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491–494, jun. 1991a.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491–494, jun. 1991b.

C. WANCURA, J. H. et al. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 648–667, 11 jul. 2020.

CACICEDO, M. L. et al. Immobilized enzymes and their applications. Em: **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology**. [s.l: s.n.].

CAO, L. et al. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4–6, p. 665–670, jan. 2001.

CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. **Organic Letters**, v. 2, n. 10, p. 1361–1364, 1 maio 2000.

CAO, X. et al. Acyl migration in enzymatic interesterification of triacylglycerols: Effects of lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus oryzae*, support material, and water activity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 10, p. 1579–1587, out. 2016.

CARBALLARES, D. et al. Immobilization of the Peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. The Effect of the Immobilization pH on the Features of an Ionically Exchanged Dimeric Peroxygenase. **Catalysts**, v. 11, n. 5, p. 560, 28 abr. 2021.

CARBALLARES, D.; ROCHA-MARTIN, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coimmobilization of lipases exhibiting three very different stability ranges. Reuse of the

active enzymes and selective discarding of the inactivated ones. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 206, n. January, p. 580–590, maio 2022.

CARDILLO, G.; TOLOMELLI, A.; TOMASINI, C. Enzymatic Resolution of α -Alkyl β -Amino Acids Using Immobilized Penicillin G Acylase. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 8651–8654, 1 jan. 1996.

CARRASCO-LÓPEZ, C. et al. Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4365–4372, fev. 2009.

CARVALHO, T. et al. Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowia lipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

CASTAÑEDA-VALBUENA, D. et al. Biological activities of peptides obtained by pepsin hydrolysis of fishery products. **Process Biochemistry**, v. 120, n. June, p. 53–63, set. 2022.

CAVALCANTE, A. L. G. et al. Chemical modification of clay nanocomposites for the improvement of the catalytic properties of Lipase A from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 120, p. 1–14, 1 set. 2022.

CAZABAN, D.; WILSON, L.; BETANCOR, L. Lipase Immobilization on Siliceous Supports: Application to Synthetic Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 96–103, 8 dez. 2016.

CHANDEL, A. K. et al. The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 3, p. 199–207, fev. 2008.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 5 jun. 2018.

CHAUBEY, A. et al. Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter sp.* lipase: Kinetic resolution of fluoxetine intermediate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1–2, p. 39–44, 2006.

CHEN, C. T. et al. An unique approach of applying magnetic nanoparticles attached commercial lipase acrylic resin for biodiesel production. **Catalysis Today**, v. 278, p. 330–334, 2016.

CHEN, W.-Y. et al. The hydrophobic interactions of the ion-exchanger resin ligands with proteins at high salt concentrations by adsorption isotherms and isothermal titration calorimetry. **Separation and Purification Technology**, v. 54, n. 2, p. 212–219, abr. 2007.

CHEN, Z. et al. Activated carbons and amine-modified materials for carbon dioxide capture — a review. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 7, n. 3, p. 326–340, 21 jun. 2013.

CHENG, F. et al. New Strategy for Functionalization of Silica Materials via Catalytic Oxa-

Michael Reaction of Surface Silanol Groups with Vinyl Sulfones. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 10, p. 9112–9120, 20 maio 2019.

CHONGKHONG, S. et al. Biodiesel production by esterification of palm fatty acid distillate. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 8, p. 563–568, ago. 2007.

COBOS-PUC, L. et al. Classical and New Pharmaceutical Uses of Bacterial Penicillin G Acylase. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 287–297, 25 mar. 2020.

CORNISH-BOWDEN, A. Analysis and interpretation of enzyme kinetic data. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1–6, p. 121–125, 2014.

COSTA-SILVA, T. A. et al. Immobilized enzyme-driven value enhancement of lignocellulosic-based agricultural byproducts: Application in aroma synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 284, p. 124728, 2021.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase11NRC publication number 42925. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2–3, p. 205–214, nov. 1999.

DA ROCHA, T. N. et al. 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**, v. 29, p. 100823, out. 2022a.

DA ROCHA, T. N. et al. Immobilization of Penicillin G Acylase on Vinyl Sulfone-Agarose: An Unexpected Effect of the Ionic Strength on the Performance of the Immobilization Process. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7587, 5 nov. 2022b.

DAKIN, H. D. The hydrolysis of optically inactive esters by means of enzymes. **The Journal of Physiology**, v. 30, n. 3–4, p. 253–263, 14 dez. 1903.

DAL MAGRO, L. et al. Optimized immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* following different protocols: Improved stability and activity under drastic conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 234–243, out. 2019.

DALLA-VECCHIA, R. et al. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, ago. 2004.

DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 10, p. 584–591, 2010.

DE ANDRADES, D. et al. Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protocol depends on the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

DE MELO, R. R. et al. New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: A tool for enzyme immobilization at neutral pH. **Molecules**, 2017.

DE OLIVEIRA, U. M. F. et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of Rhizomucor miehei Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1263–1285, abr. 2018.

DE SOUZA, T. C. et al. 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**, v. 43, n. 12, p. 2253–2268, 28 dez. 2020.

DELONG, J. P. et al. The combined effects of reactant kinetics and enzyme stability explain the temperature dependence of metabolic rates. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 11, p. 3940–3950, 2017.

DEREWENDA, U. et al. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532–1541, 11 fev. 1992.

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

DILL, K. A.; GHOSH, K.; SCHMIT, J. D. Physical limits of cells and proteomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 44, p. 17876–17882, 2011.

DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 36–46, 2005a.

DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 36–46, dez. 2005b.

DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 180–196, 2006.

DONE, S. H. et al. **Ligand-induced Conformational Change in Penicillin Acylase**. [s.l.: s.n.].

DONE, S. H. et al. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase 1 1Edited by J. Thornton. **Journal of Molecular Biology**, v. 284, n. 2, p. 463–475, nov. 1998b.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Stabilizing hyperactivated lecitase structures through physical treatment with ionic polymers. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1511–1515, maio 2014.

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

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

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

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

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 16–26, mar. 2017.

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

DOS SANTOS, K. P. et al. Co-immobilization of lipase and laccase on agarose-based supports via layer-by-layer strategy: Effect of diffusional limitations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 185, 1 jul. 2022.

DU, C. et al. Improvement of the enantioselectivity and activity of lipase from *Pseudomonas* sp. via adsorption on a hydrophobic support: kinetic resolution of 2-octanol. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 5–6, p. 340–347, 7 jan. 2009.

DU, Z. et al. Fabrication of N-acetyl-L-cysteine and L-cysteine functionalized chitosan-casein nanohydrogels for entrapment of hydrophilic and hydrophobic bioactive compounds. **Food Hydrocolloids**, 2019.

DUGGLEBY, H. J. et al. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. **Nature**, v. 373, n. 6511, p. 264–268, jan. 1995.

ERICSSON, D. J. et al. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 109–119, fev. 2008.

ESTRUCH, I. et al. Immobilization of the acylase from *Escherichia coli* on glyoxyl-agarose gives efficient catalyst for the synthesis of cephalosporins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 2, p. 121–129, jan. 2008.

FADNAVIS, N. W.; SHARFUDDIN, M.; VADIVEL, S. K. Resolution of racemic 2-amino-1-butanol with immobilised penicillin G acylase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, n. 23, p. 4495–4500, dez. 1999.

FAN, L.-Q. et al. Increasing thermal stability of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli* by site-directed saturation mutagenesis and its application in GABA production. **Journal of Biotechnology**, v. 278, p. 1–9, jul. 2018.

FERNANDES, K. V. et al. Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**,

2021.

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

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 1–2, p. 96–103, jan. 1999.

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

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

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISAN, J. M. Dynamic reaction design of enzymic biotransformations in organic media: equilibrium-controlled synthesis of antibiotics by penicillin G acylase. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 139–43, out. 1996.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISÁN, J. M. The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized penicillin G acylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 5, p. 305–310, out. 1998.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISÁN, JOSÉM. Enzyme reaction engineering: Synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 11, p. 898–905, nov. 1991.

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83868–83875, 2015.

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Improved immobilization and stabilization of lipase from Rhizomucor miehei on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl₂. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 48–52, jan. 2016a.

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Improved immobilization and stabilization of lipase from Rhizomucor miehei on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl₂. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 48–52, jan. 2016b.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 232–237, 20 abr. 2003.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Solid-Phase Chemical Amination of a Lipase from

Bacillus thermocatenulatus To Improve Its Stabilization via Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 9, p. 2553–2561, 8 set. 2008.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Hydrophobic Supports: Highly Selective Hydrolysis of Fish Oil Catalyzed by RML. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 6, p. 801–807, 5 jun. 2011.

FERREIRA, M. M. et al. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, 2018.

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2 set. 2019.

FUENTES, M. et al. Mixed Ion Exchange Supports as Useful Ion Exchangers for Protein Purification: Purification of Penicillin G Acylase from *Escherichia coli*. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 2, p. 703–707, 1 fev. 2007.

FUGANTI, C. et al. Substrate specificity and enantioselectivity of penicillinacylase catalyzed hydrolysis of phenacetyl esters of synthetically useful carbinols. **Tetrahedron**, v. 44, n. 9, p. 2575–2582, jan. 1988.

FUGANTI, C. et al. Enantioselective recognition of the phenacetyl moiety in the Pen G acylase catalysed hydrolysis of phenylacetate esters. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 3, n. 3, p. 383–386, jan. 1992.

GABOR, E. M.; DE VRIES, E. J.; JANSSEN, D. B. A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2–3, p. 182–190, fev. 2005.

GABRIEL PAULRAJ, M. et al. Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GARCÍA-GARCÍA, P.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. Capture of enzyme aggregates by covalent immobilization on solid supports. Relevant stabilization of enzymes by aggregation. **Journal of Biotechnology**, v. 325, n. November 2020, p. 138–144, 2021.

GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 633–639, jun. 1995.

GILLOOLY, J. F. et al. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. **Science**, v. 293, n. 5538, p. 2248–2251, set. 2001.

GIORDANO, R. C.; RIBEIRO, M. P. A.; GIORDANO, R. L. C. Kinetics of β -lactam

antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 27–41, jan. 2006.

GLOWACKI, D. R.; HARVEY, J. N.; MULHOLLAND, A. J. Taking Ockham's razor to enzyme dynamics and catalysis. **Nature Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 169–176, 2012.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 7–8, p. 797–812, maio 2006.

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

GRAZÚ, V. et al. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 390–398, mar. 2010a.

GRAZÚ, V. et al. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 390–398, mar. 2010b.

GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; GUISÁN, J. M. Tailor-made design of penicillin G acylase surface enables its site-directed immobilization and stabilization onto commercial mono-functional epoxy supports. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2538–2541, dez. 2012.

GRIGORENKO, B. L. et al. Catalytic Cycle of Penicillin Acylase from *Escherichia coli*: QM/MM Modeling of Chemical Transformations in the Enzyme Active Site upon Penicillin G Hydrolysis. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 8, p. 2521–2529, 1 ago. 2014.

GROCHULSKI, P. et al. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12843–12847, 1993.

GROCHULSKI, P. et al. Analogs of Reaction Intermediates Identify a Unique Substrate Binding Site in *Candida rugosa* Lipase. **Biochemistry**, v. 33, n. 12, p. 3494–3500, 1994.

GRUBECKI, I. How to run biotransformations At the optimal temperature control or isothermally? Mathematical assessment. **Journal of Process Control**, v. 44, p. 79–91, ago. 2016.

GRUBECKI, I. Optimal feed temperature for an immobilized enzyme fixed-bed reactor: A case study on hydrogen peroxide decomposition by commercial catalase. **Chemical and Process Engineering - Inżynieria Chemiczna i Procesowa**, v. 39, n. 1, p. 39–57, 2018a.

GRUBECKI, I. Optimal feed temperature for hydrogen peroxide decomposition process occurring in a bioreactor with fixed-bed of commercial catalase: A case study on thermal deactivation of the enzyme. **Chemical and Process Engineering - Inżynieria Chemiczna i Procesowa**, v. 39, n. 4, p. 491–501, 2018b.

GRUBECKI, I. Analytical determination of the optimal feed temperature for hydrogen

peroxide decomposition process occurring in bioreactor with a fixed-bed of commercial catalase. **Catalysts**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.

GRUNWALD, P. Biocatalysts: Global market, industrial applications, aspects of biotransformation design, and societal challenges. Em: **Industrial Biocatalysis**. New York: CRC Press: [s.n.]. p. 1–32.

GUAJARDO, N. et al. Asymmetric hydrolysis of dimethyl-3-phenylglutarate in sequential batch reactor operation catalyzed by immobilized *Geobacillus thermocatenulatus* lipase. **Catalysis Today**, v. 255, p. 21–26, out. 2015.

GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Synthesis of lactulose in batch and repeated-batch operation with immobilized B-galactosidase in different agarose functionalized supports. **Bioresource Technology**, 2017.

GUIMARÃES, J. R. et al. Immobilization of Eversa ® Transform via CLEA Technology Using Waste Cooking Oil. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 193, 2021.

GUIMARÃES, J. R. et al. The immobilization protocol greatly alters the effects of metal phosphate modification on the activity/stability of immobilized lipases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 2452–2466, 1 dez. 2022.

GUISAN, J. M. New opportunities for immobilization of enzymes. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 1–13, 2013.

GUISÁN, JOSÉM. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375–382, jun. 1988.

GUO, Y. et al. Proteomics analysis of asthenozoospermia and identification of glucose-6-phosphate isomerase as an important enzyme for sperm motility. **Journal of Proteomics**, v. 208, 30 set. 2019.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. **Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004.

GÜR, S. D.; İDİL, N.; AKSÖZ, N. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2018.

GÜRDAS, S.; GÜLEÇ, H. A.; MUTLU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β-Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 904–911, 2 abr. 2012.

HAN, C. et al. Enhancement of catalytic activity and thermostability of a thermostable cellobiohydrolase from *Chaetomium thermophilum* by site-directed mutagenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 691–697, set. 2018.

HARI KRISHNA, S.; PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U. T. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*. **Tetrahedron**

Asymmetry, 2002.

HARRIS, P. R. et al. Selectivity and kinetic modeling of penicillin G acylase variants for the synthesis of cephalexin under a broad range of substrate concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 119, n. 11, p. 3117–3126, 6 nov. 2022.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

HELDT-HANSEN, H. P. et al. A New Immobilized Positional Nonspecific Lipase for Fat Modification and Ester Synthesis. Em: [s.l: s.n.]. p. 158–172.

HEMU, X. et al. Immobilized Peptide Asparaginyl Ligases Enhance Stability and Facilitate Macrocyclization and Site-Specific Ligation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 1504–1512, 7 fev. 2020.

HENRIQUE DA SILVA CAVALCANTI, M. et al. Immobilization of Thermomyces lanuginosus lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 431, n. October 2021, 2022.

HERNANDEZ, K. et al. Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 6–7, p. 510–517, maio 2011.

HERNANDEZ, K. et al. Hydrogen peroxide in biocatalysis. A dangerous liaison. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 2652–2672, 2012.

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

HILTERHAUS, L.; THUM, O.; LIESE, A. Reactor Concept for Lipase-Catalyzed Solvent-Free Conversion of Highly Viscous Reactants Forming Two-Phase Systems. **Organic Process Research & Development**, v. 12, n. 4, p. 618–625, jul. 2008.

HIRATA, D. B. et al. Advantages of Heterofunctional Octyl Supports: Production of 1,2-Dibutyrin by Specific and Selective Hydrolysis of Tributyrin Catalyzed by Immobilized Lipases. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 12, p. 3259–3270, 1 ago. 2016.

HØEGH, I. et al. Two lipases from *Candida antarctica* : cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. **Canadian Journal of Botany**, 1995.

HOU, D. et al. Culture of yeast cells immobilized by alginate-chitosan microcapsules in aqueous-organic solvent biphasic system. **Journal of Oceanology and Limnology**, 2019.

HWANG, E. T.; LEE, S. Multienzymatic cascade reactions via enzyme complex by immobilization. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4402–4425, maio 2019.

ILLANES, A. et al. Reactor performance under thermal inactivation and temperature

optimization with chitin-immobilized lactase. Em: [s.l: s.n.]. p. 27–34.

ILLANES, A. Stability of biocatalysts. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 1999.

ILLANES, A.; WILSON, L. Enzyme Reactor Design Under Thermal Inactivation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 61–93, 29 jan. 2003.

ILLANES, A.; WILSON, L. Parameters for the Evaluation of Immobilized Enzymes Under Process Conditions. Em: [s.l: s.n.]. p. 65–81.

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

IZQUIERDO, D. F. F. et al. Tuning lipase B from *Candida antarctica* C-C bond promiscuous activity by immobilization on poly-styrene-divinylbenzene beads. **RSC Advances**, v. 4, n. 12, p. 6219, jan. 2014.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. **Enzyme immobilization by adsorption: A review**. **Adsorption**, 2014.

JIANG, C. et al. Concentration of n-3 polyunsaturated fatty acid glycerides by *Candida antarctica* lipase A-catalyzed selective methanolysis. **Food Bioscience**, v. 46, 1 abr. 2022.

JIANG, W. et al. Fabrication, characterization and emulsifying properties of agarose microgel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 241, p. 124565, jun. 2023.

JIN, Q. et al. Silica nanowires with tunable hydrophobicity for lipase immobilization and biocatalytic membrane assembly. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 531, p. 555–563, dez. 2018.

KADISCH, M. et al. Maximizing the stability of metabolic engineering-derived whole-cell biocatalysts. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, 2017.

KALLENBERG, A. I.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Immobilization of Penicillin G Acylase: The Key to Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 347, n. 7–8, p. 905–926, jun. 2005.

KANWAR, S. S. et al. Synthesis of geranyl butyrate with the poly(acrylic acid-*co*-hydroxy propyl methacrylate-*cl*-ethylene glycol dimethacrylate) hydrogel immobilized lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, n. 5, p. 2681–2692, 5 dez. 2008.

KARAMI, F. et al. Fast, inexpensive purification of β-glucosidase from *Aspergillus niger* and improved catalytic/physicochemical properties upon the enzyme immobilization: Possible broad prospects for industrial applications. **LWT**, v. 118, p. 108770, jan. 2020.

KARIMI, M. Immobilization of lipase onto mesoporous magnetic nanoparticles for enzymatic synthesis of biodiesel. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 182–188, 2016.

KASCHE, V. et al. Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1433, n. 1–2, p. 76–86, ago. 1999.

KASCHE, V.; GALUNSKY, B. Ionic strength and pH effects in the kinetically controlled synthesis of benzylpenicillin by nucleophilic deacylation of free and immobilized phenyl-acetyl-penicillin amidase with 6-aminopenicillanic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 104, n. 4, p. 1215–1222, fev. 1982.

KASCHE, V.; HAUFLER, U.; ZÖLLNER, R. Kinetic Studies on the Mechanism of the Penicillin Amidase-Catalysed Synthesis of Ampicillin and Benzylpenicillin. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 365, n. 2, p. 1435–1444, jan. 1984.

KAZLAUSKAS, R. Hydrolysis and Formation of Carboxylic Acid and Alcohol Derivatives. Em: **Organic Synthesis Using Biocatalysis**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 127–148.

KEKENES-HUSKEY, P. M.; SCOTT, C. E.; ATALAY, S. Quantifying the Influence of the Crowded Cytoplasm on Small Molecule Diffusion. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 33, p. 8696–8706, 2016.

KHODADADI YAZDI, M. et al. **Agarose-based biomaterials for advanced drug delivery**. **Journal of Controlled Release**, 2020.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 446–451, 1 jul. 2002.

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

KOZLOWSKA, J.; PAUTER, K.; SIONKOWSKA, A. Carrageenan-based hydrogels: Effect of sorbitol and glycerin on the stability, swelling and mechanical properties. **Polymer Testing**, 2018.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, ago. 2004.

KRISTIANSEN, E.; PEDERSEN, S. A.; ZACHARIASSEN, K. E. Salt-induced enhancement of antifreeze protein activity: A salting-out effect. **Cryobiology**, v. 57, n. 2, p. 122–129, out. 2008.

KUTZBACH, C.; RAUENBUSCH, E. Preparation and General Properties of Crystalline Penicillin Acylase from *Escherichia coli* ATCC 11 105. **Biological Chemistry**, v. 355, n. 1, p. 45–53, 1974.

LABUS, K. et al. Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 232–240, out. 2011.

LEE, C. H. et al. Evaluating enzyme stabilizations in calcium carbonate: Comparing in situ

and crosslinking mediated immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 341–350, 2021.

LEE, J. H. et al. Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 12, p. 1927–31, dez. 2008.

LEE, J. K. et al. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3048, 6 dez. 2018.

LI, K. et al. Recent progress in the development of immobilized penicillin G acylase for chemical and industrial applications: A mini-review. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 31, n. 3, p. 368–388, 7 mar. 2020.

LI, M. et al. Site-Specific and Covalent Immobilization of His-Tagged Proteins via Surface Vinyl Sulfone–Imidazole Coupling. **Langmuir**, v. 35, n. 50, p. 16466–16475, 17 dez. 2019.

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

LILJEBLAD, A. et al. Formation and hydrolysis of amide bonds by lipase A from *Candida antarctica*; Exceptional features. **Organic and Biomolecular Chemistry**, 2010.

LIMA, G. V. et al. Chemoenzymatic synthesis of (S)-Pindolol using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 546, 2017.

LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523–535, 28 abr. 2015.

LIMA, R. N. et al. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, v. 466, p. 75–105, abr. 2019.

LIN, J. et al. Enhancing catalytic performance of laccase via immobilization on chitosan/CeO₂ microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015.

LISTUNOV, D. et al. On terminal alkynylcarbinols and derivatization thereof. **French-Ukrainian Journal of Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 21–28, 2015.

LIU, H. et al. Affinity capture of aflatoxin B1 and B2 by aptamer-functionalized magnetic agarose microspheres prior to their determination by HPLC. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 7, p. 326, 12 jul. 2018.

LOKHA, Y. et al. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109461, fev. 2020a.

LOKHA, Y. et al. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*

immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109461, fev. 2020b.

LOKHA, Y. et al. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, 1 fev. 2020c.

LOKHA, Y. et al. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109461, 1 fev. 2020d.

LOMBARDO, D.; GUY, O. Effect of alcohols on the hydrolysis catalyzed by human pancreatic carboxylic-ester hydrolase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Enzymology**, v. 657, n. 2, p. 425–437, fev. 1981.

LONG, J. et al. Immobilization of pullulanase onto activated magnetic chitosan/Fe₃O₄ nanoparticles prepared by in situ mineralization and effect of surface functional groups on the stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 472, p. 69–77, maio 2015.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, 2005.

LOUHASAKUL, Y. et al. Potential use of flocculating oleaginous yeasts for bioconversion of industrial wastes into biodiesel feedstocks. **Renewable Energy**, 2019.

LOZANO, P.; BERNAL, J. M.; VAULTIER, M. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3461–3467, nov. 2011.

LUAN, B.; ZHOU, R. A novel self-activation mechanism of *Candida antarctica* lipase B. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 24, p. 15709–15714, 2017.

LUO, H. et al. Oriented Immobilization and Characterization of a Poly-Lysine-Tagged Cephalosporin C Acylase on Glyoxyl Agarose Support. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 2114–2123, 2 fev. 2015.

LUQUE, R.; CLARK, J. H. Biodiesel-Like Biofuels from Simultaneous Transesterification/Esterification of Waste Oils with a Biomass-Derived Solid Acid Catalyst. **ChemCatChem**, v. 3, n. 3, p. 594–597, 7 mar. 2011.

MALLIN, H.; HÖHNE, M.; BORNSCHEUER, U. T. Immobilization of (R)- and (S)-amine transaminases on chitosan support and their application for amine synthesis using isopropylamine as donor. **Journal of Biotechnology**, v. 191, p. 32–37, dez. 2014.

MANCHEÑO, J. M. et al. Structural Insights into the Lipase/esterase Behavior in the *Candida rugosa* Lipases Family: Crystal Structure of the Lipase 2 Isoenzyme at 1.97 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 332, n. 5, p. 1059–1069, out. 2003.

MANOEL, E. A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open

form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 2015.

MANSFELD, J. et al. Probing the Unfolding Region in a Thermolysin-like Protease by Site-Specific Immobilization. **Biochemistry**, v. 38, n. 26, p. 8240–8245, 1 jun. 1999.

MANSFELD, J.; ULRICH-HOFMANN, R. Site-specific and random immobilization of thermolysin-like proteases reflected in the thermal inactivation kinetics. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 189, 1 dez. 2000.

MANTIONE, D. et al. Low-Temperature Cross-Linking of PEDOT:PSS Films Using Divinylsulfone. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2017.

MANZO, R. M. et al. Immobilization of Carboxypeptidase A into Modified Chitosan Matrixes by Covalent Attachment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2018.

MAREŠOVÁ, H. et al. Current state and perspectives of penicillin G acylase-based biocatalyses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 7, p. 2867–2879, 21 abr. 2014.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, n. 3, p. 272–276, out. 1995.

MARTÍNEZ-MEJÍA, G. et al. Synthesis of new chitosan-glutaraldehyde scaffolds for tissue engineering using Schiff reactions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2019.

MARTY, A.; DOSSAT, V.; CONDORET, J.-S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 2, p. 232–237, 20 out. 1997.

MARUYAMA, T. et al. Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 11, p. 1121, nov. 2000.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.

MATELJAK, I. et al. Increasing Redox Potential, Redox Mediator Activity, and Stability in a Fungal Laccase by Computer-Guided Mutagenesis and Directed Evolution. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4561–4572, 3 maio 2019a.

MATELJAK, I. et al. Increasing Redox Potential, Redox Mediator Activity, and Stability in a Fungal Laccase by Computer-Guided Mutagenesis and Directed Evolution. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4561–4572, 3 maio 2019b.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment☆. **Enzyme and**

Microbial Technology, v. 26, n. 7, p. 509–515, abr. 2000a.

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

MATEO, C. et al. Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 629–634, 2002a.

MATEO, C. et al. Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 629–634, 7 jun. 2002b.

MATEO, C. et al. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 273–276, 5 maio 2004a.

MATEO, C. et al. Immobilization of lactase from Kluyveromyces lactis greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 4, p. 1259–1262, 6 ago. 2004b.

MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

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

MATSUMOTO, K. Production of 6-APA, 7-ACA, and 7-ADCA by immobilized penicillin and cephalosporin amidases. **Bioprocess technology**, v. 16, p. 67–88, 1993.

MATTOS, G. J.; BAKKER, E. Integrated enzyme-linked immunosensor with biofunctionalized ion-selective membranes by pulstrode delivery of substrate. **Biosensors and Bioelectronics: X**, v. 14, 1 set. 2023.

MEISSNER, M. P.; WOODLEY, J. M. Mass-based biocatalyst metrics to guide protein engineering and bioprocess development. **Nature Catalysis**, v. 5, n. 1, p. 2–4, jan. 2022.

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–158, 2 abr. 2020.

MELO, A. et al. Synthesis of Benzyl Acetate Catalyzed by Lipase Immobilized in Nontoxic Chitosan-Polyphosphate Beads. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2165, 2017.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Covalent attachment of lipases on glyoxyl-agarose beads: Application in fruit flavor and biodiesel synthesis. **International**

journal of biological macromolecules, v. 70C, p. 78–85, jun. 2014.

MEVADA, J. S.; WANJE, S. G.; PANDIT, A. B. Selective recovery of the intracellular enzyme using hydrodynamic cavitation: Scalable approach. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 182, 1 dez. 2022.

MIRZAEI B., E. et al. Studies on glutaraldehyde crosslinked chitosan hydrogel properties for drug delivery systems. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 2013.

MOHAMAD HANAPI, N. S. et al. Ionic liquid-impregnated agarose film two-phase micro-electrodriven membrane extraction (IL-AF- μ -EME) for the analysis of antidepressants in water samples. **Journal of Chromatography B**, v. 1046, p. 73–80, 1 mar. 2017.

MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 3, n. 5, p. 371–384, fev. 1978.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141–154, fev. 2021.

MONTES, T. et al. Chemical Modification of Protein Surfaces To Improve Their Reversible Enzyme Immobilization on Ionic Exchangers. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3052–3058, 1 nov. 2006.

MONTES, T. et al. Genetic Modification of the Penicillin G Acylase Surface To Improve Its Reversible Immobilization on Ionic Exchangers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 312–319, jan. 2007a.

MONTES, T. et al. Improved Stabilization of Genetically Modified Penicillin G Acylase in the Presence of Organic Cosolvents by Co-Immobilization of the Enzyme with Polyethyleneimine. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 3, p. 459–464, 5 fev. 2007b.

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

MORELLON-STERLING, R. et al. Effect of amine length in the interference of the multipoint covalent immobilization of enzymes on glyoxyl agarose beads. **Journal of Biotechnology**, v. 329, p. 128–142, mar. 2021a.

MORELLON-STERLING, R. et al. Advantages of Supports Activated with Divinyl Sulfone in Enzyme Coimmobilization: Possibility of Multipoint Covalent Immobilization of the Most Stable Enzyme and Immobilization via Ion Exchange of the Least Stable Enzyme. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 22, p. 7508–7518, 7 jun. 2021b.

MORELLON-STERLING, R.; BOLIVAR, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Switch off/switch on of a cysteinyl protease as a way to preserve the active catalytic group by modification with a reversible covalent thiol modifier: Immobilization of ficin on vinyl-sulfone activated supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 1155–1162, nov. 2022.

MOSBACH, K. Immobilized enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1–3, jan. 1980.

MULINARI, J. et al. Polydopamine-assisted one-step immobilization of lipase on α -alumina membrane for fouling control in the treatment of oily wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 459, 1 mar. 2023.

MÜLLER, J. et al. A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 2, p. 232–236, 12 fev. 2014.

MÜLLER, J. et al. Enhancing the Acyltransferase Activity of *Candida antarctica* Lipase A by Rational Design. **ChemBioChem**, v. 16, n. 12, p. 1791–1796, 17 ago. 2015.

MUPPALANENI, SRINATH. Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective. **Journal of Developing Drugs**, 2013.

MUZZARELLI, R. A. A. **Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids**. **Carbohydrate Polymers**, 2009.

NAGIREDDI, S.; KATIYAR, V.; UPPALURI, R. Pd(II) adsorption characteristics of glutaraldehyde cross-linked chitosan copolymer resin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 479–490, 18 abr. 2013.

NAVIA, M. A.; CLAIR, N. L. ST.; GRIFFITH, J. P. Crosslinked enzyme crystals (CLECsTM) as immobilized enzyme particles. Em: [s.l: s.n.]. p. 63–73.

NEGM, N. A. et al. **Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications**. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

NETO, L. G.; MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S. Enantioselective transesterification of a propargyl tertiary alcohol by *Candida antarctica* lipase A: A reaction medium engineering approach. **Results in Chemistry**, v. 5, p. 100966, jan. 2023.

ODA, M. et al. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 45–51, mar. 2005.

OKUR, H. I. et al. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 9, p. 1997–2014, 9 mar. 2017.

OLIVEIRA, J. F. G. et al. Biodiesel production from waste coconut oil by esterification with ethanol: The effect of water removal by adsorption. **Renewable Energy**, 2010.

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

20, n. 34, p. 7189, 2010.

ORTIZ, C. et al. **Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? Catalysis Science and Technology**, 2019.

PALOMO, J. M. et al. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, 2003.

PALOMO, J. M. et al. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, n. 1–2, p. 267–273, jun. 2004.

PALOMO, J. M. et al. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, mar. 2005.

PAN, X. et al. Efficient synthesis of β-lactam antibiotics with in situ product removal by a newly isolated penicillin G acylase. **Bioorganic Chemistry**, v. 99, p. 103765, jun. 2020.

PAN, X. et al. Strategies to Improve the Biosynthesis of β-Lactam Antibiotics by Penicillin G Acylase: Progress and Prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 18 jul. 2022.

PEDROCHE, J. et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160–1166, abr. 2007.

PENG, B. et al. Trace water activity could improve the formation of 1,3-oleic-2-medium chain-rich triacylglycerols by promoting acyl migration in the lipase RM IM catalyzed interesterification. **Food Chemistry**, v. 313, p. 126130, maio 2020.

PINHEIRO, B. B. et al. 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**, 2019.

PINTO, R. V. et al. Glutaraldehyde-crosslinking chitosan scaffolds reinforced with calcium phosphate spray-dried granules for bone tissue applications. **Materials Science and Engineering C**, 2020.

POLIZZI, K. M. et al. Stability of biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 220–225, 2007.

POLLAK, A. et al. Enzyme immobilization by condensation copolymerization into crosslinked polyacrylamide gels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 20, p. 6324–6336, 1 set. 1980.

POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydrate Polymers**, 2014.

PORATH, J.; L»»S, T.; JANSON, J.-C. Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. **Journal of Chromatography A**, v. 103, n. 1, p. 49–62, jan. 1975.

QIAN, J. Q. et al. Preparation of nano-enzyme aggregates by crosslinking lipase with sodium tripolyphosphate. **Process Biochemistry**, v. 97, n. June, p. 19–26, 2020.

QUEIROZ, M. E. C. et al. Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1174, n. 1–2, p. 72–77, dez. 2007.

RAITA, M. et al. Modification of magnetic nanoparticle lipase designs for biodiesel production from palm oil. **Fuel Processing Technology**, 2015.

RAUWERDINK, A.; KAZLAUSKAS, R. J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of α/β -Hydrolase Fold Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 10, p. 6153–6176, 2 out. 2015.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 5, p. 527–534, 5 mar. 1996.

REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 3 jul. 2018.

REN, C. et al. Selection and screening strategies in directed evolution to improve protein stability. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 53, 27 dez. 2019a.

REN, C. et al. Selection and screening strategies in directed evolution to improve protein stability. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 53, 27 dez. 2019b.

RIOS, N. S. et al. Immobilization of lipase from Pseudomonas fluorescens on glyoxyl-octyl-agarose beads: Improved stability and reusability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 9, p. 741–747, set. 2019a.

RIOS, N. S. et al. Further stabilization of lipase from Pseudomonas fluorescens immobilized on octyl coated nanoparticles via chemical modification with bifunctional agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 313–324, 1 dez. 2019b.

RITCHIE, M. E. Reaction and diffusion thermodynamics explain optimal temperatures of biochemical reactions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

ROBLES-MACHUCA, M. et al. Comparative features between recombinant lipases CALA-like from *U. maydis* and CALA from *C. antarctica* in thermal stability and selectivity. **Biotechnology Letters**, 2019.

ROCHA-MARTÍN, J. et al. Rational co-immobilization of bi-enzyme cascades on porous supports and their applications in bio-redox reactions with in situ recycling of soluble cofactors. **ChemCatChem**, v. 4, n. 9, p. 1279–1288, set. 2012.

RODA, S. et al. A Plurizyme with Transaminase and Hydrolase Activity Catalyzes Cascade Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 61, n. 37, 12 set. 2022.

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

RODRIGUES, R. C. et al. Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 641–646, 2009a.

RODRIGUES, R. C. et al. Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 2, p. 113–119, 2009b.

RODRIGUES, R. C. et al. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6–7, p. 386–393, 2009c.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963–968, set. 2009d.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, set. 2019.

RODRIGUES, R. C. et al. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. **Biotechnology Advances**, v. 52, n. August, 2021.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R. et al. Composite hydrogels based on gelatin, chitosan and polyvinyl alcohol to biomedical applications: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 2020.

ROGALSKA, E. et al. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. **Chirality**, v. 5, n. 1, p. 24–30, 1993.

ROSELL, C. M. et al. A criterion for the selection of monophasic solvents for enzymatic synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 1–2, p. 64–69, jul. 1998.

ROSSI, D.; CALCAGNI, A.; ROMEO, A. Approach to the use of benzylpenicillin acylase for configurational correlations of amino compounds. 2. Hydrolysis of N-(*p*-aminophenylacetyl) derivatives of some chiral primary amines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2222–2225, 1 jun. 1979.

RUEDA, N. et al. Reactivation of lipases by the unfolding and refolding of covalently immobilized biocatalysts. **RSC Advances**, v. 5, n. 68, p. 55588–55594, 2015a.

RUEDA, N. et al. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-

- glyoxyl agarose beads. **RSC Advances**, v. 5, n. 15, p. 11212–11222, jan. 2015b.
- RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v. 259, n. In press, p. 107–118, jan. 2016a.
- RUEDA, N. et al. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. **The Chemical Record**, v. 16, n. 3, p. 1436–1455, jun. 2016b.
- RUEDA, N. et al. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 10–18, jun. 2016c.
- RUIZ, M. et al. Palladium sorption on glutaraldehyde-crosslinked chitosan in fixed-bed systems. **Journal of Applied Polymer Science**, 2001.
- SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1–2, p. 1–9, 2006.
- SALGADO, C. A.; DOS SANTOS, C. I. A.; VANETTI, M. C. D. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, v. 45, n. November 2021, p. 101509, 2022.
- SAMPAIO, C. S. et al. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 215, n. June, p. 434–449, 2022.
- SANCHEZ, A. et al. Inactivation of immobilized trypsin under dissimilar conditions produces trypsin molecules with different structures. **RSC Advances**, v. 6, n. 33, p. 27329–27334, 2016.
- SANTIAGO, G. et al. Rational Engineering of Multiple Active Sites in an Ester Hydrolase. **Biochemistry**, v. 57, n. 15, p. 2245–2255, 17 abr. 2018.
- SANTOS, J. C. S. DOS et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 17 ago. 2015a.
- SANTOS, J. C. S. DOS et al. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 77, p. 1–7, set. 2015b.
- SANTOS, J. C. S. D. DOS et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 17 ago. 2015c.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 3 jul. 1998.
- SCHMID-DANNERT, C.; LÓPEZ-GALLEGO, F. Advances and opportunities for the design of self-sufficient and spatially organized cell-free biocatalytic systems. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 49, p. 97–104, abr. 2019.

SCHMIEG, B.; NGUYEN, M.; FRANZREB, M. Simulative Minimization of Mass Transfer Limitations Within Hydrogel-Based 3D-Printed Enzyme Carriers. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–13, 2020.

SCHNELL, S.; TURNER, T. E. Reaction kinetics in intracellular environments with macromolecular crowding: Simulations and rate laws. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 85, n. 2–3, p. 235–260, 2004.

SCHOEMAKER, H. E. Dispelling the Myths--Biocatalysis in Industrial Synthesis. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1694–1697, 14 mar. 2003.

SCHUMACHER, G. et al. Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 14, p. 5713–5727, 1986.

SELF, D. A. et al. The conversion of benzyl penicillin to 6-aminopenicillanic acid using an insoluble derivative of penicillin amidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 3, p. 337–348, maio 1969.

SEREY, M. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1564–1574, 2021.

SERRA, I. et al. Coupling of Site-Directed Mutagenesis and Immobilization for the Rational Design of More Efficient Biocatalysts: The Case of Immobilized 3G3K PGA from *E. coli*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009, n. 9, p. 1384–1389, mar. 2009.

SHANG, J. et al. An Organophosphonate Strategy for Functionalizing Silicon Photonic Biosensors. **Langmuir**, v. 28, n. 6, p. 3338–3344, 14 fev. 2012.

SHARMA, N. et al. A highly alkaline pectate lyase from the Himalayan hot spring metagenome and its bioscouring applications. **Process Biochemistry**, v. 115, p. 100–109, 1 abr. 2022.

SHELDON, R. A. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, jun. 2007.

SHELDON, R. A.; BASSO, A.; BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 10, p. 5850–5862, 2021.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future. **ChemSusChem**, v. 15, n. 9, 6 maio 2022.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 27 mar. 2013.

Sheldon, R.A.; Woodley, J.M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. [s.d.].

SHEN, X. et al. **Polyethylenimine Applications in Carbon Dioxide Capture and Separation: From Theoretical Study to Experimental Work**. Energy Technology, 2017.

SIAR, E. H. et al. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. **Process Biochemistry**, 2017a.

SIAR, E. H. et al. Amination of ficin extract to improve its immobilization on glyoxyl-agarose: Improved stability and activity versus casein. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

SIAR, E.-H. et al. Stabilization of ficin extract by immobilization on glyoxyl agarose. Preliminary characterization of the biocatalyst performance in hydrolysis of proteins. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 98–104, jul. 2017b.

SIAR, E.-H. et al. Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses. **Catalysts**, v. 8, n. 4, p. 149, abr. 2018a.

SIAR, E.-H. et al. Solid phase chemical modification of agarose glyoxyl-ficin: Improving activity and stability properties by amination and modification with glutaraldehyde. **Process Biochemistry**, v. 73, p. 109–116, out. 2018b.

SILVA, J. M. F. et al. Immobilization of Thermomyces lanuginosus lipase on a new hydrophobic support (Streamline phenylTM): Strategies to improve stability and reusability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 163, p. 110166, fev. 2023.

SOCHA, R. D.; TOKURIKI, N. Modulating protein stability - directed evolution strategies for improved protein function. **FEBS Journal**, v. 280, n. 22, p. 5582–5595, nov. 2013.

SOLER, G. et al. Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1339, n. 1, p. 167–175, 1997.

SOUZA, P. M. P. et al. Enzyme-support interactions and inactivation conditions determine Thermomyces lanuginosus lipase inactivation pathways: Functional and fluorescence studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, n. August, p. 79–91, nov. 2021.

SOUZA, P. M. P. et al. Immobilization of Lipase B from Candida antarctica in Octyl-Vinyl Sulfone Agarose: Effect of the Enzyme-Support Interactions on Enzyme Activity, Specificity, Structure and Inactivation Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14268, 17 nov. 2022.

SRIRANGAN, K. et al. Biotechnological advances on Penicillin G acylase: Pharmaceutical implications, unique expression mechanism and production strategies. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1319–1332, dez. 2013.

STERGIOU, P.-Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846–1859, dez. 2013.

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

SUN, S.; LI, K. Biodiesel production from phoenix tree seed oil catalyzed by liquid lipozyme TL100L. **Renewable Energy**, 2020.

TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. **RSC Advances**, v. 6, n. 102, p. 100281–100294, 2016.

TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, n. June, p. 415–428, 2021.

TAHERI-KAFRANI, A. et al. Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 19, p. 3160–3196, 28 out. 2021.

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

TANYELİ, C.; ÖZDEMİRİHAN, D. Chemoenzymatic route to various spirocyclic compounds based on enantiomerically enriched tertiary allylic, homoallylic, and homopropargylic alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 25, n. 8, p. 658–666, abr. 2014.

TAVANO, O. L. et al. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412–436, mar. 2018.

TEMPORINI, C. et al. Characterization and Study of the Orientation of Immobilized Enzymes by Tryptic Digestion and HPLC-MS: Design of an Efficient Catalyst for the Synthesis of Cephalosporins. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 6, p. 1623–1632, 14 jun. 2010.

TURKOVÁ, J. et al. Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3–12. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 524, n. 1, p. 162–169, maio 1978.

ULBRICH-HOFMANN, R.; ARNOLD, U.; MANSFELD, J. The concept of the unfolding region for approaching the mechanisms of enzyme stabilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, n. 1–4, p. 125–131, set. 1999.

ÜNLÜER, Ö. B.; ÖZCAN, A.; UZUN, L. Preparation of a novel hydrophobic affinity cryogel for adsorption of lipase and its utilization as a chromatographic adsorbent for fast protein liquid chromatography. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 2, p. 376–382, mar. 2014.

URRUTIA, P. et al. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

UTAMA, Q. D. et al. Lipase-Catalyzed Interesterification for the Synthesis of Medium-Long-Medium (MLM) Structured Lipids. **Food technology and biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 305–

318, 2019.

VAGHARI, H. et al. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 223–233, 15 fev. 2016.

VALDÉS, E. C.; SOTO, L. W.; ARCAYA, G. A. Influence of the pH of glutaraldehyde and the use of dextran aldehyde on the preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from Burkholderia cepacia. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 3, 13 maio 2011.

VALENCIA, P. et al. Effect of Internal Diffusional Restrictions on the Hydrolysis of Penicillin G: Reactor Performance and Specific Productivity of 6-APA with Immobilized Penicillin Acylase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 426–441, 20 set. 2011.

VAN DAELE, T. et al. A generic model-based methodology for quantification of mass transfer limitations in microreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 300, p. 193–208, 2016.

VAN TILBEURGH, H. et al. Interfacial activation of the lipase–procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 814–820, abr. 1993.

VELJKOVIĆ, M. et al. Continuous production of fructo-oligosaccharides using selectively immobilized fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus onto Purolite® A109. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 117, p. 149–156, jan. 2023.

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

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

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Reuse of anion exchangers as supports for enzyme immobilization: Reinforcement of the enzyme-support multiinteraction after enzyme inactivation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1391–1396, out. 2016.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, 2017a.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Polyethylenimine: A very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 36, p. 7461–7490, 2017b.

VOLPATO, G.; C. RODRIGUES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 32, p. 3855–3873, 1 nov. 2010.

WAHAB, R. A. et al. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, n. February, p. 104613, jul. 2020.

WALDMANN, H.; HEUSER, A.; REIDEL, A. Selective Enzymatic Deprotection of Hydroxy- and Amino Groups in Carbohydrates and Nucleosides. **Synlett**, v. 1994, n. 01, p. 65–67, 1994.

WALDMANN, H.; HEUSER, A.; SCHULZE, S. Selective enzymatic removal of protecting groups: The phenylacetamide as amino protecting group in phosphopeptide synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 48, p. 8725–8728, nov. 1996.

WANG, L. et al. One-step purification of target enzymes using interaction- and structure-based design of aptamer-affinity responsive polymers: Selective immobilization and enhanced stability. **Separation and Purification Technology**, v. 307, 15 fev. 2023.

WARBURTON, D.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. Conversion of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid in a batch reactor and continuous feed stirred tank reactor using immobilized penicillin amidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 1, p. 13–25, jan. 1973.

WILSON, L. et al. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 558–562, 5 jun. 2004.

WILSON, L. et al. Effect of lipase-lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 259–264, 2006a.

WILSON, L. et al. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 750–755, ago. 2006b.

WOODLEY, J. M. New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 21, p. 22–26, fev. 2020.

WOODLEY, J. M. Ensuring the Sustainability of Biocatalysis. **ChemSusChem**, v. 15, n. 9, 6 maio 2022.

WU, X. et al. Enhancement in catalytic activity of *Aspergillus niger* XynB by selective site-directed mutagenesis of active site amino acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 249–260, 4 jan. 2018.

XIAO, Q. et al. Preparation of macroporous rigid agarose microspheres by pre-crosslinking with cyclic anhydride. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 41–54, dez. 2022.

XIE, W.; WANG, H. Immobilized polymeric sulfonated ionic liquid on core-shell structured Fe₃O₄/SiO₂ composites: A magnetically recyclable catalyst for simultaneous transesterification and esterifications of low-cost oils to biodiesel. **Renewable Energy**, 2020.

XIE, Y. et al. Enhanced Enzyme Kinetic Stability by Increasing Rigidity within the Active Site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7994–8006, mar. 2014.

XIU, G. H.; JIANG, L.; LI, P. Mass-transfer limitations for immobilized enzyme-catalyzed kinetic resolution of racemate in a fixed-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 1, p. 29–39, 2001.

XU, X. et al. Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: Preliminary study on incorporation and acyl migration. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 301–308, fev. 1998.

YADAV, J. K.; PRAKASH, V. Thermal stability of α -amylase in aqueous cosolvent systems. **Journal of Biosciences**, v. 34, n. 3, p. 377–387, 2009.

YANG, Y.; XIONG, Y. L.; JIANG, J. Interfacial properties and inter-relationship of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in simulated muscle protein extracts: Effect of salt reduction and pea protein. **Food Hydrocolloids**, v. 137, 1 abr. 2023.

YAO, L. W. et al. Insight into immobilization efficiency of Lipase enzyme as a biocatalyst on the graphene oxide for adsorption of Azo dyes from industrial wastewater effluent. **Journal of Molecular Liquids**, v. 354, p. 118849, maio 2022.

YE, J. et al. Poly-lysine supported cross-linked enzyme aggregates of penicillin G acylase and its application in synthesis of β -lactam antibiotics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 423–428, nov. 2019.

ZAAK, H. et al. Effect of high salt concentrations on the stability of immobilized lipases: Dramatic deleterious effects of phosphate anions. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 128–134, nov. 2017a.

ZAAK, H. et al. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 67–74, nov. 2017b.

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

ZHANG, K. et al. Improving the catalytic characteristics of lipase-displaying yeast cells by hydrophobic modification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1689–1699, 24 nov. 2017.

ZHANG, Y. H. P. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 715–725, 2011.

ZHAO, H.-Y.; FENG, H. Engineering *Bacillus pumilus* alkaline serine protease to increase its low-temperature proteolytic activity by directed evolution. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 34, 1 dez. 2018.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182–197, abr. 2015.

ZHENG, F. et al. Enhancing the catalytic activity of a novel GH5 cellulase GtCel5 from *Gloeophyllum trabeum* CBS 900.73 by site-directed mutagenesis on loop 6. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 76, 22 dez. 2018.

ZHU, Y. et al. Stable immobilization of uranium in iron containing environments with microbial consortia enriched via two steps accumulation method. **Environmental Pollution**, v. 294, 1 fev. 2022.

ZMIJEWSKI, M. J. et al. Enantioselective acylation of a beta-lactam intermediate in the synthesis of loracarbef using penicillin G amidase. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 13, p. 1621–1622, mar. 1991a.

ZMIJEWSKI, M. J. et al. Enantioselective acylation of a beta-lactam intermediate in the synthesis of loracarbef using penicillin G amidase. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 13, p. 1621–1622, mar. 1991b.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1577, 19 nov. 2016a.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1577, 19 nov. 2016b.