



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Wellington Moreira Corrêa

Produção de biocatalisador através da técnica de adsorção física a partir da lipase de *Burkholderia cepacia* e estudo da influência de aditivos no processo de imobilização.

LIMEIRA

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



Wellington Moreira Corrêa

Produção de biocatalisador através da técnica de adsorção física a partir da lipase de *Burkholderia cepacia* e estudo da influência de aditivos no processo de imobilização.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção e de Manufatura na área de Manufatura de Materiais Avançados

Orientadora: Prof. Dra. Giovana da Silva Padilha

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO WELLINGTON MOREIRA CORRÊA, E ORIENTADO PELA PROF. DR^a. GIOVANA DA SILVA PADILHA.

LIMEIRA
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

C817p Correa, Wellington Moreira, 1986-
Produção de biocatalisador através da técnica de adsorção física a partir da lipase de Burkholderia cepacia e o estudo da influência de aditivos no processo de imobilização / Wellington Moreira Correa. – Limeira, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Giovana da Silva Padilha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Lipase. 2. Burkholderia cepacia. 3. Imobilização. 4. Adsorção física. 5. Aditivos. I. Padilha, Giovana da Silva, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biocatalyst production through physical adsorption using Burkholderia cepacia lipase and influence of additives in the immobilization

Palavras-chave em inglês:

Lipase
Burkholderia cepacia
Immobilization
Adsorption
Additions

Área de concentração: Manufatura de Materiais Avançados

Titulação: Mestre em Engenharia de Produção e de Manufatura

Banca examinadora:

Giovana da Silva Padilha [Orientador]
Ranyere Lucena de Souza
Larissa de Freitas

Data de defesa: 11-09-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Produção e de Manufatura

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3051-7398>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3828024598233298>

Autor: Wellington Moreira Corrêa

Título: Produção de biocatalisador através da técnica de adsorção física a partir da lipase de *Burkholderia cepacia* e estudo da influência de aditivos no processo de imobilização.

Natureza: Dissertação de Mestrado em Engenharia de Produção e Manufatura

Área de concentração: Manufatura de Materiais Avançados

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 11/09/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Giovana da Silva Padilha (Orientador) – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/UNICAMP

Prof. Dr. Ranyere Lucena de Souza
Instituto de Tecnologia e Pesquisa - ITP

Prof. Dra. Larissa de Freitas
Escola de Engenharia de Lorena - USP

Prof. Dr. Giovana da Silva Padilha (Orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido a colaboração, apoio e solidariedade de pessoas e instituições.

Primeiramente gostaria de agradecer a toda colaboração, cooperação, dedicação, responsabilidade, carinho e preocupação da minha orientadora Prof. Dra. Giovana da Silva Padilha, que em todos os momentos me proporcionou votos de confiança, possivelmente sem a presença dela nenhuma página desse trabalho seria possível, acima de tudo foi minha melhor amiga nessa fase da minha vida, sou grato de todo meu coração e tem meu respeito eterno.

Ao Prof. Dr. Ausdinir Danilo Bortolozo que esteve sempre a disposição tirando dúvidas, o que me ajudou a ingressar no curso de pós graduação e no desenvolvimento do projeto, me apoiando e colaborando antes e durante meu ingresso na pós graduação.

Ao técnico de laboratório Sr. Luiz Antônio Garcia que sempre esteve disposto a colaborar nas mais diversas idéias que surgiram durante todo percurso da pesquisa.

A Prof. Dra. Mariana Conceição da Costa que disponibilizou seu laboratório e depositou confiança para que eu pudesse manusear os equipamentos e realizar análises, sem nenhuma objeção. Muito obrigado a vocês.

A Prof. Dra. Heizir Ferreira de Castro que fez a doação dos copolímeros de PHB e PHB utilizados como suporte para imobilização da lipase neste trabalho.

Quero deixar meu muito obrigado a todos das equipes dos Laboratórios de Metalurgia, de Engenharia de Processos e de Polímeros – FCA/UNICAMP, Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração – FEQ/Unicamp e ao Instituto de Química de São Carlos – CAQI/USP, que colaboraram de maneira direta e indireta realizando análises e disponibilizando as dependências para realizar experimentos.

Gostaria de agradecer a Univesp que concedeu bolsa auxílio durante o mestrado, que ajudou a cobrir as despesas que tive.

Enfim gostaria de agradecer as únicas pessoas que amo nessa vida - minha mãe Aurinésia e meu pai Afonso que dedicaram e dedicam sua vida em período integral à minha pessoa.

RESUMO

Corrêa, W. M. **Produção de biocatalisador através da técnica de adsorção física utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* e estudo da influência de aditivos no processo de imobilização**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção e Manufatura). Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2019.

Lipases oriundas de *Burkholderia cepacia* (E.C. 3.1.1.3) tem sido de interesse para diversos bioprocessos por apresentar alta especificidade na hidrólise de ácidos graxos, assim como termoestabilidade e enantiosseletividade evitando a produção de subprodutos indesejáveis. Para aprimorar as propriedades físico-químicas e permitir sua reutilização durante vários ciclos, as lipases podem ser imobilizadas em suportes sólidos. Entre os diversos métodos de imobilização, a de adsorção física é prático, rápido e de custo acessível, quando comparado a outras técnicas. A eficácia da imobilização pode ser aumentada com o uso de aditivos. Os aditivos podem contribuir de diversas formas como por exemplo, na diminuição do risco de lixiviação durante sua aplicação em bioprocessos, aumento da atividade enzimática, estabilidade estrutural e química, aumento dos grupos funcionais em suportes entre outras características. Neste trabalho foi imobilizada a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBc) em suportes poliméricos e não poliméricos. Resultados preliminares revelaram baixos valores em atividade hidrolítica para os suportes não poliméricos, quando comparados aos suportes poliméricos, fazendo com que as análises de caracterização fossem efetuadas apenas nos suportes poliméricos que apresentaram melhores resultados em atividade hidrolítica. Os melhores resultados de retenção da lipase foram observados para os suportes poliméricos polihidroxibutirato (PHB), polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV) e estireno-divinilbenzeno (ST-DVB) obtendo respectivas atividades hidrolíticas de 608 ± 15 U/g, 183 ± 9 U/g e 247 ± 12 U/g. A fim de aumentar a eficiência da imobilização, foram avaliadas as influências dos aditivos polietilenoglicol (PEG), Triton X-100 (TX) e glutaraldeído (GA). A adição dos aditivos resultou no aumento da atividade hidrolítica dos derivados. O PHB-LBc na presença de PEG apresentou atividade hidrolítica de 917 ± 20 U/g e para o ST-DVB-LBc na presença de PEG e TX de 901 ± 45 U/g. Entretanto o suporte de PHBV não apresentou melhorias significativas com o uso dos aditivos. Para observar as mudanças para a lipase e suportes antes e após a imobilização foram realizadas análises instrumentais. Primeiramente foram realizadas as análises físico-químicas através de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR-ATR), mostrando que após a imobilização foi possível observar bandas de absorção adicionais relacionadas aos grupos funcionais referentes à lipase; a avaliação da morfologia da superfície foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO). As imagens obtidas por MEV mostraram que após a imobilização os suportes apresentam uma fina camada sobre sua superfície que possivelmente pode estar relacionada a presença da lipase. Já as imagens por MO revelaram que diferentes etapas do processo, como a imersão em solução de álcool etílico, podem alterar a morfologia da superfície do

suporte, mudanças significativas foram mais visíveis ao suporte de PHB; análises térmicas foram obtidas por termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) revelaram que após a imobilização houve aumento na perda de massa dos suportes, além disso os suportes com lipase apresentaram maior entalpia de seu sistema, essas mudanças podem ser atreladas a lipase presente nos suportes, aumentando a variação da perda de massa e energia do sistema; a estrutura foi caracterizada através de difratometria de raio-X (DRX) mostrando que os suportes poliméricos apresentaram alterações pouco significativas em suas estruturas após a imobilização. A técnica de adsorção física com uso de aditivos para LBc nos suportes de PHB e ST-DVB apresentaram resultados de atividade hidrolítica satisfatórios, podendo ser aplicada a outras enzimas e na síntese de bioprodutos.

Palavras-chave: lipase, *Burkholderia cepacia*, imobilização, adsorção física, aditivos.

ABSTRACT

Corrêa, W. M. **Biocatalyst production through physical adsorption using *Burkholderia cepacia* lipase and influence of additives in the immobilization technique.** Dissertation (Master in Production and Manufacturing Engineering). School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, 2019

Burkholderia cepacia lipases (E.C. 3.1.1.3) have been of interest with application in distinct bioprocesses due to their high specificity in the hydrolysis of fatty acids, as well as thermostability and enantioselectivity. Thus, the production of undesirable by-products is prevented. In order to improve the physicochemical properties and to provide their reuse for several cycles, onto the solid supports the lipases are immobilized. Among the distinct methods of immobilization, the physical adsorption is practical, fast and affordable when compared to other techniques. With the use of additives, the effectiveness of immobilization can be increased. Additives contribute in different procedures, for instance, in the decrease of leaching during bioprocess applications, in the increase of enzyme activity, in the structural and chemical stabilities, in the increase of the functional groups in supports, and other characteristics. In this investigation, *Burkholderia cepacia* lipase (BcL) is immobilized on both the polymeric and non-polymeric supports. It is found that lower values of the hydrolytic activity on the non-polymeric substrates than the polymeric substrates. The characterizations are carried out only on the polymeric substrates due to their hydrolytic activity values attained. The highest results of the lipase retention are those of the polymeric polyhydroxybutyrate (PHB), polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) and styrene-divinylbenzene (ST-DVB) supports. These correspond with the hydrolytic activities of 608 ± 15 U/g, 183 ± 9 U/g and 247 ± 12 U/g, respectively. In order to increase the immobilization efficiency, the influences of the additives polyethylene glycol (PEG), Triton X-100 (TX) and glutaraldehyde (GA) are evaluated. An increase in the hydrolytic activity of the derivatives is reached when the additives are adopted. PHB-BcL in the presence of PEG shows a hydrolytic activity of 917 ± 20 U/g. When the ST-DVB-LBc in the presence of PEG and TX are used, a hydrolytic activity of 901 ± 45 U/g is attained. Additionally, PHBV support has no significant improvements with the use of additives. In order to observe the changes to the lipase and supports before and after immobilization, instrumental analyzes are performed. At first, the physical-chemical analyzes are conducted using Fourier transform spectroscopy (FTIR-ATR). It is found that after immobilization the additional absorption bands related to the functional groups referring to lipase is attained. Scanning electron microscopy (SEM) and optical microscopy (OM) are used to evaluate the surface morphology. The typical SEM images show that after immobilization the supports, a thin layer on their surface related with the presence of lipase is obtained. The OM images reveal that different stages of the process, such as immersion in ethyl alcohol solution, modifies the surface morphology, and meaningful changes are more visible to the PHB support. The thermogravimetry

(TGA) and differential exploratory calorimetry (DSC) analyzes reveal that after the immobilization, an increase in the mass loss of the supports is attained. Besides, the addition the supports with lipase demonstrates a high enthalpy. This seems to be linked to lipase onto supports, which increase the variation in the loss of mass and energy of the system. X-ray diffractometry (XRD) is utilized to the structural characterization. It is found that the polymeric supports are not significantly modified after immobilization. The technique of physical adsorption with the use of additives associated with BcL on PHB and ST-DVB supports demonstrate satisfactory hydrolytic activity results, revealing their potential utilization with other enzymes and in the bioproducts synthesis.

Keywords: lipase, Burkholderia cepacia, immobilization, physical adsorption, additions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de setores com aplicação de enzimas.	22
Figura 2: Estrutura tridimensional da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	26
Figura 3: Imobilização das enzimas por aprisionamento.	28
Figura 4: Imobilização das enzimas por reticulação.	29
Figura 5: Imobilização das enzimas por adsorção física: interações fracas e ligação covalente.	30
Figura 6: Células bacterianas contendo grãos de PHAs sintetizados em seu interior.	31
Figura 7: Estabilização da forma aberta da lipase induzida por Triton X-100.	34
Figura 8: Suportes utilizado na imobilização da LBC: sílica gel (a), carvão ativado (b), casca de ovo (c), polihidroxibutirato (d), polihidroxibutirato-co-valerato (e) e estireno divinilbenzeno (f).	41
Figura 9: Atividade hidrolítica da LBC imobilizada em PHB, PHBV, ST-DVB, SG, CA e CO comparada à lipase na forma livre (antes da imobilização).	42
Figura 10: Atividade hidrolítica em função da razão mássica (suporte:lipase) para os suportes: PHB, PHBV e ST-DVB.	46
Figura 11: Atividade relativa em função da velocidade de rotação do agitador orbital.	48
Figura 12: Atividade relativa em função das diferentes temperaturas.	49
Figura 13: Energia de ativação para os derivados PHB-LBC, PHBV-LBC e ST-DVB-LBC.	51
Figura 14: Atividade relativa em função de diferentes valores de pH para a lipase na forma livre e imobilizada.	52
Figura 15: Comportamento do derivado de PHB-LBC na estabilidade em pH (a) 6, (b) 8 e (c) 10.	55
Figura 16: Comportamento do derivado de PHBV-LBC na estabilidade em pH (a) 6, (b) 8 e (c) 10.	55
Figura 17: Comportamento do derivado de ST-DVB-LBC na estabilidade em pH (a) 6, (b) 8 e (c) 10.	56
Figura 18: Atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos suportes poliméricos PHB, PHBV e ST-DVB na ausência e presença de PEG1500 à 5%.	58
Figura 19: Atividade hidrolítica absoluta (U/g) da lipase imobilizada nos suportes poliméricos PHB, PHBV e ST-DVB na ausência e presença de Triton X-100 à 10%.	59
Figura 20: Esquema da possível interação do tensoativo com a lipase impedindo a movimentação da tampa protetora.	60
Figura 21: Atividade hidrolítica absoluta (U/g) da lipase imobilizada nos suportes poliméricos PHB, PHBV e ST-DVB com e sem glutaraldeído.	61
Figura 22: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBC em PHB.	63
Figura 23: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBC em PHB. Com as concentrações das combinações entre os aditivos reduzidas em 50%.	64
Figura 24: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBC em PHBV.	65
Figura 25: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBC em PHBV. Com as concentrações das combinações entre os aditivos reduzidas em 50%.	65

Figura 26: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBC em ST-DVB.....	66
Figura 27: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBC em ST-DVB. Com as concentrações das combinações entre os aditivos reduzidas em 50%.....	66
Figura 28: Espectro da Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> e grupo amida característico das cadeias proteicas que formam a estrutura da lipase.....	71
Figura 29: Estrutura química dos suportes de a) PHB e b) PHBV.....	72
Figura 30: Espectro de FTIR-ATR, do suporte PHB, lipase livre e derivado PHB-LBC.	72
Figura 31: Espectro de FTIR-ATR, do suporte PHBV, lipase livre e derivado PHBV-LBC. .	73
Figura 32: Estrutura química do polímero de ST-DVB.	74
Figura 33: Espectro de FTIR-ATR, do suporte ST-DVB, lipase livre e derivado ST-DVB-LBC.	74
Figura 34: Representação da estrutura do tensoativo Triton X-100.	75
Figura 35: Espectrograma dos derivados de PHB, PHBV e ST-DVB na presença e ausência de Triton X-100.	76
Figura 36: Estrutura química do polietilenoglicol.	77
Figura 37: Espectrograma dos derivados de PHB-LBC (a), PHBV-LBC (b) e ST-DVB-LBC (c) na presença e ausência de PEG-1500.	77
Figura 38: Estrutura química do glutaraldeído	78
Figura 39: Espectrograma dos derivados de PHB, PHBV e ST-DVB na presença e ausência de Glutaraldeído.	79
Figura 40: Curvas da TGA e DTG para a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> livre.....	81
Figura 41: Curvas da TGA e DTG para o suporte de PHB e seu derivado PHB-LBC.	82
Figura 42: Curvas da TGA e DTG para o suporte de PHBV e seu derivado PHBV-LBC.	83
Figura 43: Curvas da TGA e DTG para o suporte de ST-DVB e seu derivado ST-DVB-LBC.	84
Figura 44: Curva de DSC para o polímero PHB, derivado PHB-LBC e lipase livre.	87
Figura 45: Curva de DSC para o polímero PHBV, derivado PHBV-LBC e LBC livre.....	87
Figura 46: Curva de DSC para o polímero PHB, derivado PHB-LBC e LBC livre.	88
Figura 47: Microscopia ótica dos grãos do polímero PHB (a) antes da imobilização, (b) em solução de álcool etílico e (c) após a imobilização.	90
Figura 48: Microscopia ótica dos grãos do polímero PHBV (a) antes da imobilização, (b) em solução de álcool etílico e (c) após a imobilização.	91
Figura 49: Microscopia ótica dos grãos do polímero ST-DVB (a) antes da imobilização, (b) em solução de álcool etílico e (c) após a imobilização.....	91
Figura 50: Imagens 3D do suporte de PHB (a) antes da imobilização, (b) imerso em solução de álcool etílico (95% v/v) e (c) (após a imobilização.	92
Figura 51: Imagens 3D do suporte de PHBV (a) antes da imobilização, (b) imerso em solução de álcool etílico (95% v/v) e (c) (após a imobilização.	92
Figura 52: Imagens 3D do suporte de ST-DVB (a) antes da imobilização, (b) imerso em solução de álcool etílico (95% v/v) e (c) (após a imobilização.	93
Figura 53: Morfologia da lipase comercial de <i>Burkholderia cepacia</i> (a) e dissolvida em solução tampão (10 mM) (b). Aumento de 500x.....	95
Figura 54: Análise morfológica da superfície do PHB antes (a) e após (b) a imobilização. Aumento de 5000 x.	96
Figura 55: Análise morfológica da superfície do PHBV antes (a) e após (b) a imobilização. Aumento de 5000 x.	96

Figura 56: Análise morfológica da superfície do ST-DVB antes (a) e após (b) a imobilização. Aumento de 5000 x.	97
Figura 57: Difratoograma da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	98
Figura 58: Difratoograma do suporte PHB puro e imobilizado.	99
Figura 59: Difratoograma do suporte PHBV puro e imobilizado.....	100
Figura 60: Difratoograma do suporte ST-DVB puro e imobilizado.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas de acordo com suas específicas reações catalíticas.....	23
Tabela 2: Subclasses das hidrolases de acordo com o tipo de reação catalítica.	24
Tabela 3: Rendimento em esterificação da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> comparada a outras lipases em diversas reações	25
Tabela 4: Tabela de atividade hidrolítica relativa da estabilidade em pH 6, 8 e 10 dos derivados de PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc após 45 dias de incubação.	54
Tabela 5: Tabela de ensaios dos aditivos GA, PEG e TX individuais e suas combinações. ...	57
Tabela 6: Concentrações e combinações dos aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc nos suportes poliméricos. * – ausência de aditivos.	63
Tabela 7: Rendimento do imobilizado de PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc.....	68
Tabela 8: Tabela de identificação do comprimento de onda dos grupos funcionais para análise espectral.....	70
Tabela 9: Tabela de perda de massa para LBc e para os suportes poliméricos, antes e após a imobilização.	80
Tabela 10: Tabela de variação de entalpia (ΔH) entre o suporte, derivado-LBc e derivado-LBc-aditivo.....	86
Tabela 11: Variação do tamanho dos polímeros antes, em solução alcoólica e após a imobilização.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE - Agência Internacional de Energia

CA - Carvão ativado

CO - Casca de ovo

FTIR-ATR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier modo de Reflexão Total Atenuada

DSC - Calorimetria diferencial de varredura

DTA - Análise térmica diferencial

ENDO - Endotérmico

EXO - Exotérmico

GA - Glutaraldeído

LBc - Lipase de *Burkholderia cepacia*

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MO - Microscopia óptica

PEG - Polietilenoglicol

PHB - Polihidroxibutirato

PHBV - Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato

SA - Solução alcoólica

SG - Sílica gel

ST-DVB - Estireno divinilbenzeno

TGA - Análise termogravimétrica

TX – Triton X-100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Objetivo	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Catalisadores	20
2.2. Enzimas	21
2.3. Lipases.....	25
2.4. Imobilização	27
2.5. Suportes	30
2.6. Aditivos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Materiais.....	35
3.2. Metodologia.....	36
3.2.1. Imobilização por adsorção física	36
3.2.2. Preparação dos suportes e uso de aditivos.....	37
3.2.2.1. Funcionalização do carvão ativado com H ₂ SO ₄ e KOH	37
3.2.2.2. Preparação dos suportes CO, SG, PHB, PHBV e ST-DVB	37
3.2.2.3. Preparação e adição dos aditivos	37
3.2.3. Efeitos das condições reacionais: carregamento de lipase, pH, temperatura e velocidade de agitação.....	38
3.2.4. Determinação da atividade hidrolítica da lipase.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1. Imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> e pré-seleção dos suportes	42
4.2. Caracterização dos derivados PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc	45
4.2.1. Razão mássica	45
4.2.2. Efeito da velocidade do agitador orbital.....	47
4.2.3. Efeito da temperatura	49
4.2.4. Efeito do pH	51
4.3. Estudo da influência do uso dos aditivos.....	57
4.3.1. Influência do polietilenoglicol 1500 (PEG).....	57
4.3.2. Influência do Triton X-100 (TX).....	59
4.3.3. Influência do glutaraldeído (GA)	61
4.3.4. Efeito da combinação entre os aditivos no processo de imobilização da LBc	62
4.3.5. Rendimento do imobilizado	68

4.4.	Caracterização estrutural do polímero e do derivado imobilizado	69
4.4.1.	Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)	69
4.4.1.1.	FTIR-ATR para os derivados na ausência de aditivos	70
4.4.1.2.	FTIR-ATR dos derivados na presença de aditivos	75
4.4.1.2.1	Triton X-100	75
4.4.1.2.2.	Polietilenoglicol.....	77
4.4.1.2.3.	Glutaraldeído	78
4.4.2.	Análises Térmicas	80
4.4.2.1.	Análise Termogravimétrica (TGA)	80
4.4.2.2.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	85
4.4.3.	Microscopia Ótica	89
4.4.4.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	95
4.4.5.	Difratometria de raios X.....	98
5.	PERSPECTIVA	101
6.	PUBLICAÇÕES	103
7.	CONCLUSÃO	104
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICES A:	Espectrogramas	123

1. INTRODUÇÃO

As reações químicas podem acontecer espontaneamente, porém algumas podem ser muito lentas. Uma maneira de agilizar a reação é a adição de catalisadores, capazes de diminuir o tempo de reação e aumentar o rendimento nas sínteses de produtos (Guldhe *et al.*, 2015). Os catalisadores podem ser de origem química ou biológica. Catalisadores químicos são muito utilizados na produção industrial devido ao custo acessível, porém necessitam de grandes quantidades de energia e geram subprodutos indesejáveis (Ramos *et al.*, 2011; Wheeldon; Christopher; Blanc, 2017; Li *et al.*, 2018).

As enzimas são potenciais catalisadores biológicos por possuírem características específicas e vantajosas quando comparadas aos catalisadores químicos, pelos quais não são consumidas durante a reação, gerando poucos subprodutos, possuem alta enantiosseletividade e especificidade. Em contrapartida seu valor é alto quando comparado ao catalisador químico (Tran; Balkus, 2011; Drout; Robson; Farha, 2019; Chen; Arnold, 2020).

As enzimas podem ser aplicadas em várias reações de diversos seguimentos: farmacêuticas, cosméticas, médicas, têxteis, alimentícias e bioenergia. Devido a sua natureza orgânica, auxilia na diminuição do impacto ambiental nos setores produtivos. Existe uma diversidade de enzimas responsáveis por acelerar diversas reações bioquímicas, dentre elas as lipases. Na produção de biocombustíveis as lipases são as responsáveis pela hidrólise dos lipídios na obtenção do éster (Tran; Balkus, 2011; Vaghari *et al.*, 2016; Sheldon; Woodley, 2018; Hwang; Lee, 2019; Basso; Serban, 2019; Bilal; Iqbal, 2019).

As principais desvantagens do uso de biocatalisadores enzimáticos estão relacionadas à sua instabilidade bioquímica (termossensibilidade, mudanças bruscas de pHs e uso de solventes), dificuldade de remoção e reutilização, o que onera o processo (Tran; Balkus, 2011; Chapman; Ismail; Dinu, 2018; Encinar *et al.*, 2019). Com a finalidade de minimizar esses problemas, obtendo resultados satisfatórios com o uso das enzimas, pesquisadores desenvolveram as técnicas de imobilização. A técnica permite que a enzima permaneça ligada ou confinada a um suporte que proporciona melhoria em suas propriedades, facilitando o reciclo e tornando economicamente atrativa. Diversas técnicas de imobilização foram criadas, para que

pudessem atender as mais variáveis classes enzimáticas (Cao; Langer; Sheldon, 2003; Zhang *et al.*, 2015; Vaghari *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Fernandez-Lopez *et al.*, 2017; Drout; Robion; Farha, 2019; Hwang; Lee, 2019).

As técnicas mais comuns são: aprisionamento em redes poliméricas/ encapsulação, reticulação e adsorção física. A técnica utilizada varia de acordo com a enzima, dependendo da escolha na imobilização pode ocasionar mudança da estrutura da lipase devido as fortes interações ocorridas com o suporte, impulsionando o movimento da parte móvel localizada próximo ao sítio ativo chamada de tampa protetora ou *lid*, sua movimentação pode levar a inativação da enzima por cobrir o sítio ativo, impedindo a formação do bioproduto (Beran *et al.*, 2016).

Entre os diferentes métodos de imobilização, a adsorção física não covalente pode ser vantajosa por ser simples, não necessitar de várias etapas, econômica e não alterar facilmente o sítio ativo, evitando assim sua modificação química e estrutural. As forças que mantêm a lipase adsorvida ao suporte são interações do tipo hidrofóbicas e de van der Waals (Carvalho; Lima; Soares, 2015).

A desvantagem da técnica está nos problemas ocasionados durante as reações, onde o biocatalisador pode sofrer lixiviação, devido ao tipo de ligação formada entre o suporte/enzima, causando a remoção da enzima e a mudança na estrutura da lipase devido às características do meio reacional (Nelson; Lehninger; Cox, 2008; Chapman; Ismail; Dinu, 2018; Encinar *et al.*, 2019). Entretanto, a rápida recuperação do suporte permite uma nova imobilização, o que acaba sendo bem visto no setor industrial onde mais se emprega esta técnica de imobilização (Carvalho; Lima; Soares, 2015).

A imobilização por adsorção física pode ter suas desvantagens minimizadas através da escolha do suporte e do uso de aditivos durante o processo de imobilização. Os aditivos podem agir na conformação estrutural da lipase, fazendo com que não tenha movimentação da tampa protetora do sítio ativo, auxiliando na adsorção da lipase ao suporte e aumentando a quantidade de grupos funcionais na superfície dos suportes (Ozyilmaz, 2009; Thangaraj *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018).

Alguns critérios são essenciais para a escolha dos suportes, como por exemplo: custo, porosidade, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, quantidade de grupos funcionais, área superficial, resistência mecânica e química (Souza *et al.*, 2017). A afinidade lipase-suporte entre as cargas presentes nas paredes porosas do suporte e da

lipase é que regem as melhores condições de imobilização (Carvalho; Lima; Soares, 2015).

A estratégia de imobilização e modificação química também pode melhorar as propriedades da lipase no suporte. Segundo RIOS *et al.* (2018), os grupos funcionais presentes no glutaraldeído (GA), atuam como agente de reticulação, desta forma durante o processo de síntese do bioproduto, as perdas da lipase por lixiviação ou arraste são minimizadas. Tensoativos não iônicos como o Triton – X100 (TX) possui a capacidade de interagir com o sítio ativo da lipase evitando a movimentação da tampa hidrofóbica. Estabilizantes como o polietilenoglicol (PEG) melhoram a solubilidade da lipase em solventes orgânicos, hidrofílicos e hidrofóbicos, estabelecendo adequadas condições na biotransformação do substrato em produto nos meios reacionais (Yunos *et al.*, 2014; Rios *et al.*, 2018).

A partir destas premissas, este trabalho teve por finalidade a produção de biocatalisador utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* (LBc). A LBc foi escolhida por se tratar de enzima que possui termotolerância e considerável desempenho na síntese de ésteres em meios não aquosos, auxiliando na biotransformação de diversos bioprodutos (Li *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2013; Abaházi; Boros; Poppe, 2014; Oliveira *et al.*, 2015; Sasso *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2019).

Foram analisados, na etapa de imobilização por adsorção física diferentes suportes poliméricos e não poliméricos, tais como polihidroxibutirato (PHB), polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV), copolímero de estireno divinilbenzeno (ST-DVB), sílica gel (SG), carvão ativado (CA) e casca de ovo (CO). PEG, TX e GA foram utilizados em conjunto e separadamente nos derivados (lipase-suporte) a fim de avaliar o comportamento da atividade hidrolítica. A melhora da eficiência catalítica do derivado lipase-suporte proporciona aumento do valor agregado e a substituição gradativa dos convencionais catalisadores químicos, contribuindo assim com a química verde e sustentabilidade do planeta.

1.1. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBc) por adsorção física utilizando suportes poliméricos e não poliméricos de forma prática sem a necessidade de muitas etapas de preparação do suporte.

Avaliar os derivados enzimáticos quanto ao carregamento, temperatura, pH, velocidade de rotação do agitador orbital e energia de ativação para reação de hidrólise;

Analisar os grupos funcionais, a perda de massa da lipase livre, imobilizada e suportes através das respectivas técnicas: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR), Termogravimetria (TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC);

Analisar morfológicamente os derivados usando Microscopia óptica (MO) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Caracterizar microestruturalmente a lipase, os suportes puros e os derivados por Difractometria de raios X (DRX).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Catalisadores

Os catalisadores têm sido aplicados desde a antiguidade na produção de pães, queijos e vinhos. Porém o termo catalisador ou poder catalítico surgiu apenas em 1835 quando Jons Jacob Berzelius analisando vários experimentos, de forma isolada, observou que a mera presença de alguns elementos específicos nas reações causavam a desinibição em uma dada substância que acelerava a produção, sem causar alterações químicas entre os reagentes (Roberts, 2000; Nur, 2006).

Os catalisadores então foram definidos como substâncias capazes de despertar afinidades inibidas entre os reagentes em temperaturas específicas apenas por sua mera presença, e desempenha um papel importante nos organismos vivos. Os catalisadores passaram a fazer parte de reações como um agente capaz de diminuir o tempo para atingir o equilíbrio do sistema. Quando utilizados em processos reversíveis são igualmente eficientes na forma direta e reversa. (Gallezot; Richard, 1998; Roberts, 2000; Nur, 2006; Basale, 2013). Os catalisadores podem ser dos tipos químicos e biológicos (Seh *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2020).

Catalisadores químicos podem ser classificados como básicos, ácidos ou de superfície. Os catalisadores ácidos ou básicos são utilizados comumente na obtenção de produtos a base de petróleo. Os catalisadores básicos tem maior aplicação por ser menos corrosivo que os ácidos, possuem alto poder de conversão catalítica e baixo

custo. Porém não é possível a sua reutilização, o produto final em geral, precisa de neutralização, são sensíveis na presença de água, necessitam de matéria prima de alta qualidade para que sejam evitadas reações adversas e de etapas adicionais na linha de produção (López *et al.*, 2005; Sanchez, 2016; Qiu, 2017; Yldirim; Mudaber; Ozturk, 2019).

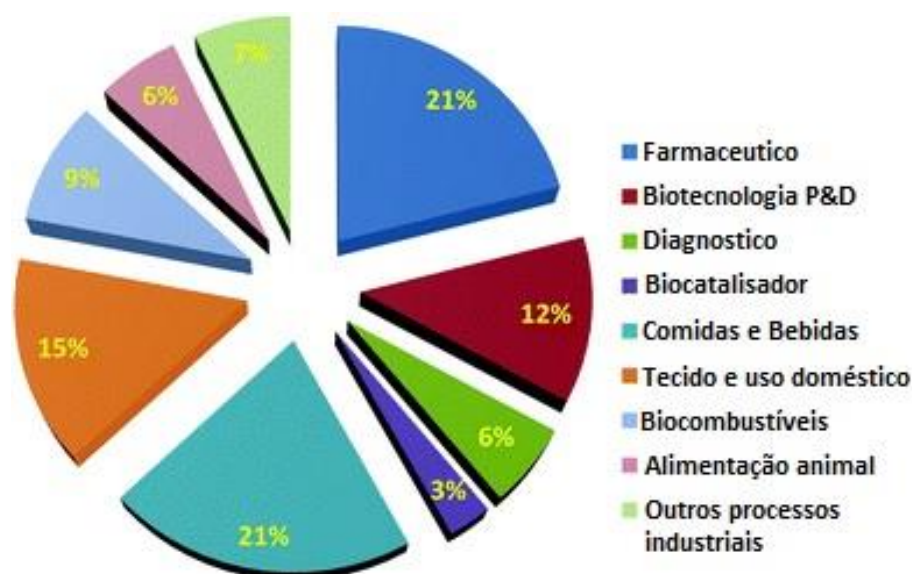
Catalisadores de superfície estão em fase diferente dos reagentes, podem ser encontrados nos escapamentos de carros movidos a álcool ou gasolina contendo metais de transição em sua fase sólida. Em contato com o gás da combustão aumentam a velocidade na formação de gases com menor teor de toxicidade (Ertl *et al.*, 2017). O problema encontrado no uso dos catalisadores químicos está na necessidade de altas energias, pode apresentar toxicidade, baixa especificidade, geração de subprodutos tornando necessárias etapas subsequentes para purificação do produto de interesse (Gross; Ganesh; Lu, 2010).

Os catalisadores enzimáticos possuem vantagens em substituição aos catalisadores químicos convencionais por não necessitarem de grandes quantidades de energia, por atuarem em diversos valores de pH, chegam a apresentar poder catalítico de 10^8 vezes maior em algumas reações, além de não reagirem com os reagentes e substratos gerando poucos subprodutos (Di Cosimo *et al.*, 2013; Rehman *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2019). Sua desvantagem está no alto valor da enzima, que pode encarecer o processo. Existem milhares de enzimas capazes de sintetizar diversos bioprodutos, na sequência serão apresentadas as principais classes de enzimas e suas principais aplicações (Rehman *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019; Basso; Serban, 2019).

2.2.Enzimas

As enzimas são formadas por conjuntos proteicos capazes de realizar transformações químicas nos sistemas vivos, orgânicos e inorgânicos, realizando a transformação dos substratos em produtos específicos, com capacidade de sintetizar macro e micromoléculas. Nos seres vivos são capazes de metabolizar de sistemas simples até os mais complexos (Oliveira; Mantovani, 2009). Além de fazer parte das reações orgânicas naturais nos seres vivos, as enzimas têm sido aplicadas em diversos setores como representado na Figura 1.

Figura 1: Distribuição de setores com aplicação de enzimas.



Fonte: Adaptado de Di Cosimo et al., 2013.

Partindo de um novo conceito onde a preocupação com os impactos ambientais está em paralelo com o desenvolvimento de novas fontes de energia, procedimentos envolvendo a biocatálise e a biotransformação é tecnologicamente atrativo (Oliveira; Mantovani, 2009). Existem vários tipos de enzimas capazes de sintetizar diversos bioprodutos, as principais fontes de obtenção de enzimas são: animais, plantas e microrganismos (fungos, leveduras e bactérias).

Com o avanço nos procedimentos biotecnológicos utilizando como catalisador as enzimas, em 1956 a União Internacional de Bioquímica criou a Comissão Internacional de Enzimas que criaram padrões para sua classificação e em 1961, a nomenclatura, dividindo as enzimas em seis classes. Em 2018 houve o desmembramento de alguns tipos de enzimas que não se encaixavam em nenhuma das classes criadas anteriormente, totalizando sete classes de enzimas, *Enzyme Commission Numbers (NEC)*, que estão sucintamente descritas na Tabela 1 (Tipton; McDonald, 2018).

Tabela 1: Classificação das enzimas de acordo com suas específicas reações catalíticas.

Enzimas		NEC	Classificação	Exemplo	Aplicações
1	Oxirredutase	EC 1	Responsáveis por reações de oxirredução e transferência de elétrons	Tirosinase Versátil; Xantina Oxidoreductase	Biorremediação de poluentes fenólicos, na construção de biossensores, para identificação de compostos fenólicos e catabolismo de purinas (Min, 2019; Jankowska <i>et al.</i> , 2013)
2	Transferase	EC 2	Transferência de grupos funcionais amina, fosfato, acil, carboxil entre moléculas	Glutathione S-transferases; Oxalato CoA-transferase	Detoxificação e excreção celular; reação da conversão de cetoadetato em Acetil CoA (Freitas; Junior; Masuda, 2008; Heider, 2001)
3	Hidrolase	EC 3	Catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes, atuam na interface água/óleo	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	Aplicação na indústria de biotecnologia e alimentícia; produção de biocombustíveis; ésteres aromáticos; indústria de papéis (Padilha <i>et al.</i> , 2018; Gibbs <i>et al.</i> , 2010)
4	Liases	EC 4	Quebra de ligações duplas, adição ou remoção de água, amônia ou dióxido de carbono	Liase de pectato bacteriano; Liases de ramnogalacturonano	Degradação da pectina em alimentos ingeridos, degradação de polissacarídeos em plantas (Hugouvieux-Cotte-Pattat; Condemine; Shevchik, 2014; Otten, 2018)
5	Isomerasas	EC 5	Reações de interconversão de isômeros óticos ou geométricos	Glucosamina-6-fosfato desaminase; Peptidil-prolil-isomerasas	Desenvolvimento de fármacos antifúngicos, antibacterianos, antiparasitários e antitumorais (Viana; Prado; Alves, 2008; Rizzolio; Tuccinard, 2019)
6	Ligases	EC 6	Formam novas moléculas a partir de moléculas pré-existent	Ligases de DNA; E3 Ubiquitina ligases	Ligação de cadeias de DNA (Cao, 2002; Ardley; Robinson, 2005)
7	Translocases	EC 7	Catálise do movimento de íons e moléculas através de membranas ou pela separação destes na membrana	Translocase de carnitina-acilcarnitina; Translocases Mray	Auxilia na produção de proteínas farmacêuticas; reações químicas em seres vivos (Pande <i>et al.</i> , 1993; Henrich <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: Autoria própria.

As hidrolases representam a maior parte das enzimas utilizadas em processos industriais, sendo de grande interesse biotecnológico (Messias *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2016; Paramjeet; Manasa; Korrapati, 2018; Chapman; Ismail; Dinu, 2018). As hidrolases são divididas em subgrupos específicos segundo a natureza da reação catalisada, conforme apresenta a Tabela 2.

Tabela 2: Subclasses das hidrolases de acordo com o tipo de reação catalítica.

Nome sistemático	Nome trivial	Reação
Hidrolase de éster carboxílico	Carboxilesterase	Éster carboxílico + H ₂ O $\rightleftharpoons$ Álcool + Carboxilato
Fosfohidrolase monoéster ortofosfórica	Fosfatase alcalina	Monoéster ortofosfórico H ₂ O $\rightleftharpoons$ Álcool + Ortofosfato
α -1,4-glucano 4-glucano-hidrolase	α -amilase	Hidrolisa as ligações α -1,4-glucana no amido
Mucopeptídeo N-acetilmuramil-hidrolase	Lisozima	Hidrolisa as ligações β -1,4-lignina no peptidoglicano
Ttripsinização por tripsina	Tripsina	Hidrolisa peptídeos, amidas e ésteres de L-aminoácidos aromáticos
L-arginina amidino-hidrolase	Arginase	L-Arginina + H ₂ O $\rightleftharpoons$ L-Ornitina + Ureia
Oxaloacetato acetil-hidrolase	Oxaloacetase	Oxaloacetato + H ₂ O $\rightleftharpoons$ Oxalato + Acetato

Fonte: Adaptado de Punekar, 2018.

As hidrolases carboxilesterase são de grande interesse dentro da biotecnologia na produção de ésteres. Entre as esterases, as esterases verdadeiras (CE 3.1.1.1, hidrolases de éster carboxílico) e as lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol-hidrolases) possuem maior destaque. As lipases vêm se destacando nos processos biotecnológicos principalmente na produção de biocombustíveis, devido sua especificidade e enantiosseletividade, em hidrólise de substratos insolúveis em água, por exemplo, os triacilgliceróis compostos por ácidos graxos de cadeia longa, diferente das esterases que hidrolisam apenas ésteres simples a partir de ácidos graxos de cadeias curtas (Lopes *et al.*, 2011; Daiha *et al.*, 2015; Amini *et al.*, 2017; Chapman; Ismail; Dinu, 2018; Li *et al.*, 2019; Zhong *et al.*, 2020). Devido estas características, a lipase foi escolhida para este estudo e será discutida no próximo tópico.

2.3.Lipases

As propriedades das lipases proporcionam a conversão de matéria-prima simples em produtos de alto valor agregado, sendo assim de grande interesse para as indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, detergentes, polpas e biocombustíveis (Zhang; He; Simpson, 2018; Rios *et al.*, 2018; Rehm; Chen; Rehm, 2018; Basso; Serban, 2019). As lipases são subclasses das esterases, entre as diferentes fontes, as oriundas de *Burkholderia cepacia*, tem atraído a atenção principalmente na produção de biocombustíveis por apresentar especificidade e bons rendimentos em esterificação como mostra a Tabela 3, baixa ou nenhuma produção de resíduos, estabilidade em meios orgânicos, termoestabilidade enantiosseletividade e regioseletividade (Oliveira; Matovani, 2009; Adlercreutz, 2013; Moreira *et al.*, 2019).

Tabela 3: Rendimento em esterificação da lipase de *Burkholderia cepacia* comparada a outras lipases em diversas reações

Lipase	Óleo	Álcool	Rendimento de éster (%)	Referências
<i>Burkholderia Cepacia</i>	Óleo de coco	Etanol	98,2	Mijone <i>et al.</i> , 2020
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de coco	Etanol	97,2	Mijone <i>et al.</i> , 2020
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de cpc	Etanol	80,5	Lisboa <i>et al.</i> , 2018
<i>Burkholderia cepacia</i>	Resíduos de óleo de cozinha	Metanol	91	Mijone <i>et al.</i> , 2020
<i>Candida antarctica</i>	Resíduos de óleo de cozinha	Metanol	72	Elgharbawy; Moniruzzaman; Goto, 2020
<i>Burkholderia cepacia</i>	Ácido oleico	Etanol	100	Salum <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida rugosa</i>	Ácido oleico	Etanol	86,5	Foresti; Errazu; Ferreira, 2005

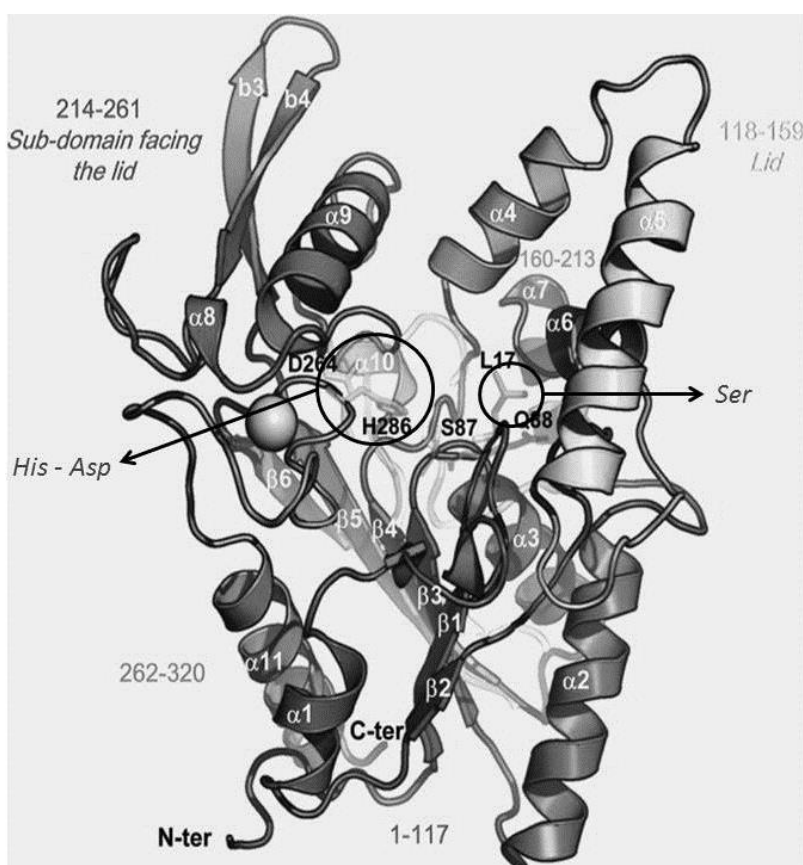
Fonte: Autoria própria.

A enantiosseletividade e a regioseletividade são propriedades pertinentes para lipases. Enantiosseletividade trata-se da capacidade de identificar diferentes enantiômeros, ou seja, moléculas quimicamente iguais, porém de conformação

estrutural invertida, por exemplo, moléculas quirais (Davankov, 1997). Regiosseletividade é a habilidade em identificar a posição das ligações em moléculas, por exemplo, diferenciar um éster primário de um éster secundário (Nara *et al.*, 2004).

A estrutura da lipase de *Burkholderia cepacia* representada na Figura 2, consiste em um arranjo formado por duas fitas de aminoácidos, α (hélices) e β (setas) interligadas e em seu centro encontra-se a tríade catalítica. A tríade catalítica formada por resíduos de Ser-His-Asp encontram-se distante na linearidade da lipase, porém, em seu arranjo tridimensional faz com que elas se aproximem formando sítio ativo, como evidenciado ao centro da estrutura da lipase presente na Figura 2, que pode estar exposto ou não. Isso acontece devido a estrutura não rígida da lipase, que pode sofrer alterações dependendo da natureza do ambiente, movimentando as fitas de aminoácidos cobrindo o sítio ativo, impedindo o acesso do substrato (Barbe *et al.*, 2009; Tomar; Aggarwal, 2017).

Figura 2: Estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia*.



Fonte: Barbe *et al.*, 2009.

Algumas características da lipase como a possibilidade de inibição do sítio ativo, insolubilidade em alguns solventes, dificuldade na separação do meio reacional,

acaba onerando o processo. Porém quando imobilizadas, ou seja, fixadas a um suporte, podem tornar-se atrativas pela possibilidade de reutilização em novos ciclos de reações e operações contínuas, além de melhorar suas propriedades e características físico-químicas (Hasan; Shah; Hameed, 2006; Rios *et al.*, 2018; Basso; Serban, 2019). A seguir serão discutidas as principais técnicas de imobilização enzimáticas.

2.4. Imobilização

GRUBHOFFER e SCHLEITH (1953) descreveram a primeira tentativa de confinar enzimas em material insolúvel. Pesquisadores observaram que a imobilização não garantia somente a possível reutilização das enzimas, mas também conferia melhorias em suas propriedades físico-químicas, a partir de então a biotecnologia tem aprimorado a técnica de imobilizar enzimas (Carvalho *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Asmat; Husain, 2018; Padilha *et al.*, 2018).

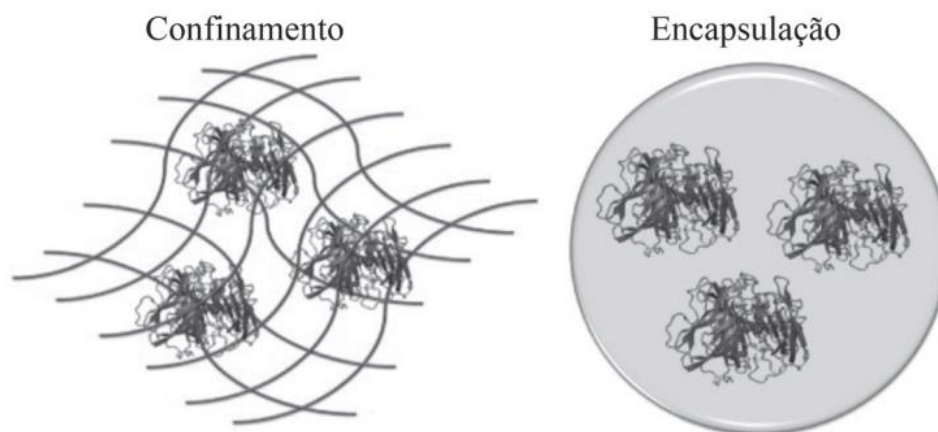
Não existe um protocolo específico para imobilizar enzimas, os procedimentos variam de acordo com as limitações das enzimas e características do suporte como material, compatibilidade química, aplicação e custo. As técnicas utilizadas para imobilizar enzimas, podem ser divididas em três categorias: aprisionamento, reticulação e ligação a um suporte (Sheldon; Van Pelt, 2013; Fernandez-Lopez *et al.*, 2017; Xie; Zang, 2017; Sheldon; Woodley, 2018).

Aprisionamento: Nesta técnica as enzimas são inclusas em polímeros orgânicos ou inorgânicos (poliacrilamina ou sílica gel), em materiais que contenham espaços entre suas membranas (fibras ocas) ou são microencapsuladas (alginato de sódio) (Figura 3). No aprisionamento, a enzima está presente no material que formará a matriz polimérica, ou seja, a lipase faz parte do material que constitui o suporte (Cazaban; Wilson; Betancor, 2017; Bilal *et al.*, 2018; Hoffman *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2019).

Entretanto, nesses sistemas a enzima não consegue ser recuperada, além disso, é difícil controlar o tamanho dos poros formados durante o processo de solidificação (sol-gel), que pode dificultar o contato com o substrato devido ao tamanho dos poros formados ou perda da atividade enzimática durante a formação do imobilizado causados pelas mudanças que ocorrerem na estrutura da enzima durante a

solidificação. Na encapsulação, a enzima fica encoberta por camadas da matriz polimérica, isto muitas vezes dificulta o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (Sheldon; Van Pelt, 2013; Carvalho; Lima; Soares, 2014; Fabra *et al.*, 2019).

Figura 3: Imobilização das enzimas por aprisionamento.

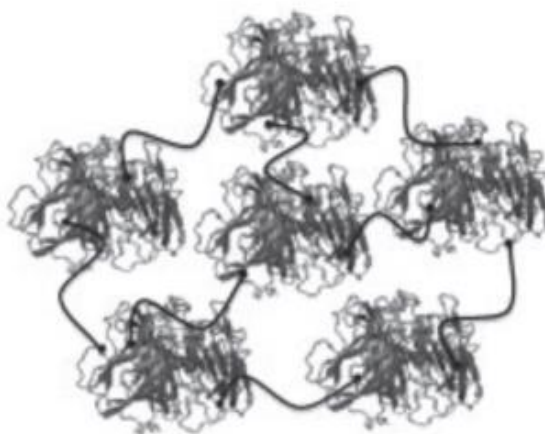


Fonte: Resende et al., 2017.

Reticulação: A reticulação é formada a partir de enzimas (solubilizadas, cristalizadas, atomizadas ou agregadas). Nesta técnica, a modificação da superfície da matriz com agentes bifuncionais são requeridos para aumentar a eficiência da imobilização, uma vez que sem os agentes, as ligações entre matriz e enzima são fracas. O biocatalisador é formado com alta concentração de enzima e devido aos agentes bifuncionais, este se torna estável (Resende *et al.*, 2017; Capecchi *et al.*, 2018; Yang; Olstad; Reyes-de-Corcuera, 2020).

Entretanto, as camadas que se formam sobre a enzima podem inibir a sua atividade, devido às sobreposições, ou a enzima se encontra situada profundamente dentro da matriz que torna o acesso do substrato ao sítio ativo inacessível. Outro tipo de reticulação são as por ligações cruzadas que mantém a enzima fortemente ligadas ao suporte. Porém, os agentes de reticulação (materiais não catalíticos) podem alterar a estrutura da enzima cobrindo o sítio ativo, resultando na baixa produtividade nas reações de biotransformação (Sheldon; Van Pelt, 2013; Resende *et al.*, 2017). A Figura 4 exemplifica esta técnica de imobilização.

Figura 4: Imobilização das enzimas por reticulação.



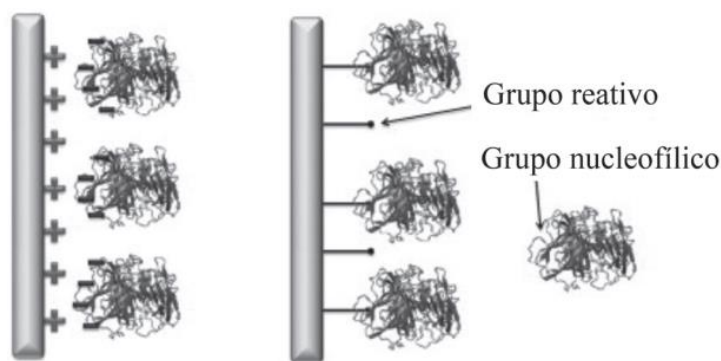
Fonte: Resende et al., 2017.

Adsorção física: A imobilização, a partir de uma matriz sólida, pode acontecer de duas formas, como mostra a Figura 5. A imobilização por adsorção física através de ligações covalentes formam fortes interações entre a lipase e o suporte, garantindo que haja pouca ou nenhuma lixiviação da lipase durante as reações de biotransformação. Em contrapartida, as fortes ligações podem modificar a estrutura da enzima, inativando-a. Além disso, impossibilitam a dessorção da lipase do suporte, impossibilitando a reutilização tanto da enzima, quanto do suporte (Sheldon; Van Pelt, 2013; Resende *et al.*, 2017; Shuai *et al.*, 2017; Zaak *et al.*, 2017).

Já a imobilização por adsorção física em suportes por interações de van der Waals ou interações hidrofóbicas não alteram a estrutura da lipase por serem ligações fracas, é simples e de baixo custo, porém, há possibilidade de sofrer lixiviação durante sua aplicação em bioprocessos (Sheldon; Van Pelt, 2013; Resende *et al.*, 2017; Fabra *et al.*, 2019).

A adsorção física através de interações tem se mostrado atrativa devido a não necessidade de etapas antecessoras à imobilização, além disso a escolha do suporte pode ajudar na eficiência da imobilização assim como no custo do processo de imobilização. Ainda o suporte pode ser facilmente regenerado quando a enzima se tornar inativa nos ciclos de reações (Vilas Bôas *et al.*, 2018).

Figura 5: Imobilização das enzimas por adsorção física: interações fracas e ligação covalente.



Fonte: Resende et al., 2017.

2.5. Suportes

Lipases hidrofílicas tendem a ter maior afinidade por suportes hidrofílicos e lipases hidrofóbicas por suportes hidrofóbicos. A eficiência do derivado lipase-suporte está relacionada com o tipo de suporte, diversos tipos de materiais podem ser utilizados para imobilização enzimática. Não existe protocolo do melhor suporte a determinado tipo de enzima, as características variam de acordo com a especificidade da enzima e as condições do substrato que serão utilizados nos bioprocessos (Miletic *et al.*, 2009). Algumas características são comuns na escolha dos suportes: apresentar área superficial disponível, grupos funcionais em sua superfície, permeabilidade, resistência mecânica e química, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência a ataque microbiano, insolubilidade, porosidade e custo (Souza *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2018; Abahazi *et al.*, 2018; Velicic *et al.*, 2020).

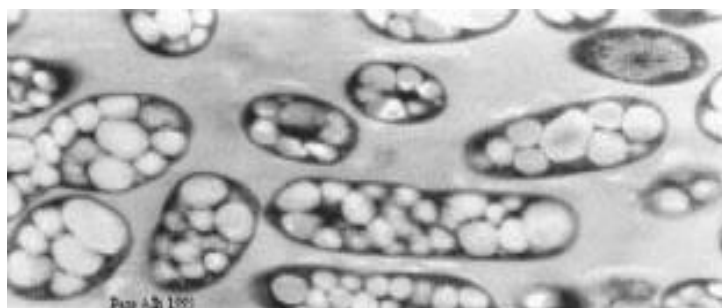
Os suportes podem ser de origem orgânica ou inorgânica. Os suportes inorgânicos, na maioria das vezes, necessitam de várias etapas antecedentes a imobilização para ativação e funcionalização de suas superfícies, devido a ausência de grupos funcionais capazes de ligar-se às enzimas, são exemplos desses materiais: sílica gel, carvão ativado, celite, hidroxilapatita e alumina (Blanco *et al.*, 2004; Adlercreutz, 2013). Os suportes orgânicos podem ser de origem natural ou sintéticos.

Entre os suportes orgânicos, os poliméricos naturais ou sintéticos são de maior interesse para os processos biotecnológicos devido suas propriedades físico-químicas e resistência a diferentes tipos de solventes. Com o aumento da preocupação

ambiental os materiais poliméricos orgânicos tem ganhado espaço dentro da biotecnologia, devido a sua baixa toxicidade, resistência e biodegradabilidade (Souza *et al.*, 2017). Além disso, possuem elevada resistência mecânica, que os tornam atrativos em sistemas com agitação (Vilas Bôas *et al.*, 2018).

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são exemplos de polímeros orgânicos biodegradáveis sintetizados por bactérias. São formados pelos monômeros ácido 3-hidróxi butanóico e 3-hidróxi pentanóico. Quando há limitação de nutrientes (N, P, S, O ou Mg) e excesso de fonte de carbono, os PHAs se acumulam intracelularmente nas bactérias (Figura 6) como reserva de carbono e energia (Pandian *et al.*, 2009; Thiré; Arruda; Barreto, 2011; Senhorini *et al.*, 2012). Mais de 90 hidroxialcanoatos foram relatados como PHAs, mas os polihidrobunitatos (PHBs) e o polihidroxibutirato-co-hidroxivaleratos (PHBV) são os derivados mais comuns dos PHAs. Estes biopolímeros apresentam propriedades mecânicas e termodinâmicas próximas ao polipropileno (PP), com vantagem adicional de ser completamente biodegradável e produzido a partir de recursos naturais, em substituição aos oriundos do petróleo (Choi *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2007; Pandian *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2012).

Figura 6: Células bacterianas contendo grãos de PHAs sintetizados em seu interior.



Fonte: Da SILVA et al., 2007.

O estireno divinilbenzeno (ST-DVB), apesar de não ser um polímero natural, também é atrativo em processos biotecnológicos, com potenciais características como suporte na imobilização de enzimas, devido a sua superfície porosa, resistência físico-química e baixa toxicidade (Adlercreutz, 2013). Autores destacam que o uso de ST-DVB no processo de imobilização, aumenta a carga proteica da enzima no suporte (Martins *et al.*, 2013).

Independente da escolha do suporte, durante a imobilização ocorre interação com a enzima e em algumas ocasiões levam a inibição parcial ou total devido ao deslocamento da tampa protetora, cobrindo o sítio ativo. Alguns materiais podem não possuir grupos funcionais em sua superfície dificultando ou impedindo as interações com a enzima. Esses problemas podem ser eliminados ou minimizados com o uso de aditivos (Rios *et al.*, 2018).

2.6. Aditivos

Os aditivos podem aumentar a eficiência da imobilização, mantendo disponível o sítio ativo da enzima e formando interações entre o suporte/enzima. Os aditivos podem ser adicionados com contato direto com o suporte ou na solução enzimática causando a interação suporte, aditivo e enzima. Podem atuar como dispersantes de moléculas da enzima na solução enzimática, evitar a inativação durante e após a imobilização e formar grupos funcionais nas superfícies dos suportes. A seleção do aditivo varia de acordo com o tipo de enzima, no caso das lipases, aditivos macromoleculares tem mostrado grande eficiência na ativação da enzima, devido o revestimento formado na interface impedindo a mudança de sua estrutura (Soares; Santana, 2003; Rios *et al.*, 2018).

As enzimas mantêm suas estruturas tridimensionais em equilíbrio devido às interações hidrofóbicas, interações de cargas eletrostáticas, ligações de hidrogênio, ligações de dissulfeto e forças de paredes internas. Mas quando em contato com solventes ou substratos, as enzimas sofrem perturbações nas forças que mantêm a sua estrutura estática, o que pode inibir o sítio ativo devido ao movimento das tampas protetoras (Kumar *et al.*, 2016). Alguns aditivos usados durante as preparações dos derivados, aumentam a estabilidade da lipase ao suporte (Cheng *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2018; Mesa *et al.*, 2018).

Dentre os aditivos, o polietilenoglicol (PEG) é um polímero simples, solúvel em água e em vários solventes orgânicos, sendo de interesse em diversas áreas da biotecnologia. Este polímero não prejudica proteínas ou células ativas, apesar de interagir com suas membranas, não reage quimicamente, mantendo suas estruturas químicas inalteradas, que pode ocasionar no aumento de tamanho das partículas do imobilizado, controla a solubilidade e não é tóxico (Harris, 2013).

O PEG pode ser usado como um espaçador na imobilização, oferecendo maior liberdade e movimento, forma camada anfifílica sobre a estrutura da lipase, garantindo que o sítio ativo fique exposto, evitando assim a movimentação das tampas protetoras em meios aquosos e entre solventes hidrofóbicos (Wang; Hsieh, 2004; Cheng *et al.*, 2018).

Outro exemplo de aditivo utilizado durante a imobilização é o Triton X-100 (TX) que é um surfactante tensoativo que devido sua estrutura polar e apolar possui afinidade em meios oleosos e aquosos. É formador de emulsões, suspensões, propiciam a umectação, formação de filmes líquidos e detergência de superfícies (Daltin, 2011). Durante a imobilização, pode haver movimentação das tampas protetoras devido ao meio no qual a enzima foi dispersa ou devido às interações com o suporte, fazendo com que as tampas protetoras hidrofóbicas cubram o sítio ativo (Mateo *et al.*, 2007).

Os tensoativos interagem com as partes hidrofóbicas e hidrofílicas da estrutura da lipase, devido sua estrutura com regiões de diferentes polaridades, a região hidrofílica da enzima corresponde ao sítio ativo, a hidrofóbica às tampas protetoras do sítio ativo, proporcionando estabilidade na estrutura da enzima (Thakar; Madamwar, 2005; Mateo *et al.*, 2007).

A Figura 7 esquematiza a ação do tensoativo durante a imobilização. Desta forma, os detergentes garantem que a estrutura não se mova em direção ao sítio ativo, garantindo alto desempenho catalítico ao biocatalisador ou derivado (Mateo *et al.*, 2007). Neste trabalho será utilizado o termo derivado para se referir a lipase imobilizada no suporte.

Outros aditivos proporcionam melhorias aos suportes, aumentando a quantidade de grupos funcionais em suas superfícies, por exemplo, o glutaraldeído. O glutaraldeído pode ser utilizado como agente funcionalizador ou de reticulação, formando grupamento amino primário na superfície dos suportes, possibilitando ligações com o grupamento amino das proteínas. As ligações entre esses agrupamentos são extremamente fortes e podem causar modificação na estrutura da enzima, afetando suas propriedades físico-químicas. O uso deste aditivo pode melhorar as condições térmicas, manter o pH mais estável e aumentar a atividade enzimática (Barbosa *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2018).

Figura 7: Estabilização da forma aberta da lipase induzida por Triton X-100.



Fonte: Adaptado de Mateo *et al.*, 2007.

No entanto, a quantidade de glutaraldeído no processo de imobilização ainda é algo a ser discutido, uma vez que maiores quantidades causam a polimerização do glutaraldeído e podem levar à inibição do poder catalítico do derivado. De forma individual, cada aditivo proporciona benefícios específicos na imobilização enzimática. Quando utilizados em conjunto específico e dosagens apropriadas, podem oferecer maior desempenho catalítico à lipase e melhor retenção nos suportes (Betancor *et al.*, 2006; Rios *et al.*, 2018).

Fica evidente que o uso das enzimas é de grande interesse dentro de vários seguimentos industriais (Messias *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2016; Paramjeet; Manasa; Korrapati, 2018; Chapman; Ismail; Dinu, 2018). Entre as enzimas as lipases, em especial as oriundas da *Burkholderia cepacia*, vem apresentando destaque pois podem ser aplicadas desde a produção de alimentos à produção de combustíveis. Fica evidente também que o uso das lipases imobilizadas oferece maior rentabilidade ao processo, devido aos benefícios causados pela imobilização, por exemplo estabilidade térmica, em solventes e principalmente a possibilidade de reciclo do derivado, sendo assim possível usá-los em finitos ciclos (Oliveira; Matovani, 2009; Adlercreutz, 2013; Moreira *et al.*, 2019).

Além disso, ao fim dos ciclos de uso do derivado é possível reaproveitar os suportes, utilizando em um novo procedimento de imobilização, pois as

características do suporte geralmente não se perdem nos processos. O uso de suportes biodegradáveis como CO, CA, PHB, PHBV e ST-DVB chamam a atenção aos processos que envolvem enzimas pois estão associados aos processos sustentáveis, de menor impacto ambiental. As propriedades que os suportes apresentam como disponibilidade de grupos funcionais, porosidade, resistência química e mecânica entre outras, viabilizam o processo de imobilização, entretanto algumas dessas propriedades podem ser proporcionadas aos suportes ou aumentadas com o uso de aditivos (Souza *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2018; Abahazi *et al.*, 2018; Velicic *et al.*, 2020).

Os aditivos podem proporcionar melhorias às propriedades dos suportes e enzima, por exemplo, agentes reticulantes como o glutaraldeído podem proporcionar o aumento da quantidade de grupos funcionais na superfície do suporte que se ligam a lipase durante a imobilização. Os aditivos podem agir na otimização da imobilização diretamente na lipase, é o exemplo dos surfactantes como o Triton X-100 e o polietilenoglicol que podem oferecer maior rigidez à estrutura da lipase mantendo o sítio ativo exposto ao substrato (Barbosa *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2018). Muitos outros aditivos e suportes podem ser utilizados na imobilização e otimização do processo (Cheng *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2018).

Diante das características e propriedades apresentadas no corpo deste trabalho para lipase, suporte e aditivos, serão demonstradas na sequência, as etapas de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*, assim como sua caracterização e do seu derivado, analisando a efetividade do uso dos mesmos nos procedimentos de imobilização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Biocatalisador: Lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (Sigma Aldrich - St. Louis/USA).

Suportes: Poli-hidroxibutirato (PHB), Poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), copolímero de estireno-divinilbenzeno (ST-DVB, Diaion HP-20) (Sigma Aldrich - St. Louis - USA); carvão ativado (CA) (Synth - Diadema/Brasil), sílica gel

(SG) (Merk – Darmstadt/Alemanha); casca de ovo (CO) branca obtido em mercado local.

Reagentes: Acetona, ácido cítrico anidro, álcool etílico absoluto (99,5%, v/v), bicarbonato de sódio, biftalato de potássio, carbonato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio bibásico, hidróxido de potássio, ácido sulfúrico, polietileno glicol 1500 e Triton X-100 (Synth - Diadema/Brasil). Goma Arábica (Oxoid – London/UK). Fosfato de sódio monobásico e solução alcoólica de fenolftaleína (1%, m/v) (Dinâmica - Indaiatuba/Brasil). Glutaraldeído (Vetec - Duque de Caxias/RJ). Azeite de oliva com acidez máxima de 0,5% (Carbonell) obtido no mercado local.

Equipamentos: Espectrômetro Bruker, modelo Tensor 27 com acessório ATR de seleneto de zinco, analisador termogravimétrico TG/DTA/DSC (TA Instruments - Q600 e DSC Netzsch 404 F3), microscópio óptico (Leica DM 2700M), microscópico eletrônico de varredura (MEV)- Zeiss LEO 440 e 440i com detector Oxford (modelo 7060), difratômetro de raio X Panaltical, modelo X'Pert com tubo de emissão de cobre (Cu-K α), balança analítica com precisão de 10^{-4} g (Shimadzu - AUY220), pHmetro de bancada (Tecnal - TEC7), bomba a vácuo (Millipore Waters), agitador magnético (Fisatom - 752), estufa de secagem e esterilização (Solab - SL100), câmara incubadora refrigerada com agitador orbital (Marconi - MA830), bureta digital (Jencons Digitrat Pro - 50 mL), foram utilizados para os demais procedimentos.

3.2. Metodologia

3.2.1. Imobilização por adsorção física

A lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada de acordo com a metodologia proposta por PERSON, WEHTJE E ADLERCREUTZ (2000), com algumas modificações. Para promover a abertura dos canais e poros dos suportes, determinada massa de cada suporte foram imersos separadamente em solução de álcool etílico (95%, v/v), permanecendo sob condições estáticas por 18 h à temperatura ambiente (27 ± 2 °C). Após este período, foram lavados repetidas vezes com água destilada para remoção do álcool residual e filtrados sob vácuo. A LBc foi diluída em água destilada, na proporção de 0,5g de lipase para cada 20 ml de água destilada, e homogeneizada a 250 rpm por 10 min (27 ± 2 °C). Após a homogeneização, o suporte foi adicionado à solução enzimática na relação 1:1 carregamento $\text{mg}_{\text{lipase}}/\text{mg}_{\text{suporte}}$ e mantidos nas condições 150 rpm por 12 h para adsorção da lipase ao suporte. Após este período, os derivados foram filtrados sob

vácuo, lavados novamente com água destilada e armazenados a 5 ± 1 °C por 24 h antes do uso.

3.2.2. Preparação dos suportes e uso de aditivos

3.2.2.1. Funcionalização do carvão ativado com H_2SO_4 e KOH

Para o carvão ativado foram utilizadas metodologias na funcionalização utilizando como agente ativador ácido sulfúrico (H_2SO_4) e hidróxido de potássio (KOH) de acordo com BRITO (2016). Para o H_2SO_4 , o suporte foi embebido a 85% (v/v), e para o KOH foi utilizada a relação $g_{\text{suporte}}:g_{\text{KOH}}$ 1:0,25 (m/m). Ambas as soluções com os suportes foram mantidas em estufa a 105 °C por 24 e 48 h, respectivamente. Após, os suportes foram e lavados exaustivamente com água destilada à 60 ± 2 °C até a solução filtrada atingir o pH 7. Então os suportes foram novamente levados a estufa à 105 ± 1 °C por 24 h para completa retirada de água residual. Na sequência, os suportes funcionalizados foram utilizados na imobilização da lipase conforme a Seção 3.2.1.

3.2.2.2. Preparação dos suportes CO, SG, PHB, PHBV e ST-DVB

As cascas de ovos foram inicialmente lavadas com água destilada em abundância, filtrados sob vácuo secas e colocadas em estufa á temperatura ambiente por 48 horas para evaporação da água. Após este período, as cascas de ovos foram trituradas com o auxílio de um cadinho de porcelana e pistilo e em seguida separadas granulométricamente em peneiras com granulometria entre 180 e 220 mm. Após a separação o suporte foi utilizado na imobilização da lipase conforme a Seção 3.2.1. Os suportes de SG, PHB, PHBV e ST-DVB não passaram por nenhuma etapa de preparação.

3.2.2.3. Preparação e adição dos aditivos

- Polietilenoglicol 1500

Em frascos reagentes cilíndricos, foi preparada uma solução de 5%, m/v de PEG 1500 em água destilada, na sequência a lipase foi adicionada a solução, na proporção de 0,5g de lipase para cada 20 ml de solução, e homogeneizada. Então adicionado o suporte à solução seguindo a metodologia descrita na Seção 3.2.1.

- Triton X-100

Em frascos reagentes cilíndricos (100 mL), foi preparada uma solução de (1% v/v) de Triton-X100. Na sequência foi preparada uma nova solução na proporção de 10% de solução de TX (1%) em água destilada, após a lipase foi adicionada à solução (na proporção de 0,5g de lipase para cada 20ml de solução de 10% de TX) e homogeneizada. Então adicionado o suporte à solução seguindo a metodologia descrita na Seção 3.2.1.

- Glutaraldeído

Em frascos reagentes cilíndricos (100 mL), os suportes poliméricos passaram pela etapa de funcionalização em solução de glutaraldeído à 2,5% (v/v). A suspensão foi mantida sob agitação a 150 rpm por 2 h (27 ± 2 °C). Ao final do tempo de funcionalização dos suportes, estes foram filtrados sob vácuo com água destilada em abundância. E então os suportes foram utilizados seguindo a metodologia descrita na Seção 3.2.1.

3.2.3. Efeitos das condições reacionais: carregamento de lipase, pH, temperatura e velocidade de agitação

A caracterização sobre as condições reacionais foram realizadas na seguinte sequência:

- Efeito da razão mássica

Foram analisadas variações do carregamento de lipase por grama de suporte nas razões 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:4, todos m/m, nas mesmas condições reacionais conforme descrição da Seção 3.2.1, mantendo constantes o pH (7), temperatura (50 °C) e velocidade de agitação do agitador orbital (150 rpm).

- Efeito da velocidade de rotação do agitador orbital

Mantendo-se constante a temperatura (50 ± 1 °C) e pH (7) e razão mássica do suporte/lipase foi de 1:1, foi analisada a influência da velocidade de rotação do agitador orbital de 50 a 250 rpm para cada derivado obtido, uma vez que estas são as velocidades permitidas pelo equipamento.

- Efeito da temperatura

A influência da temperatura na faixa de 20 a 70 °C foi analisada. Neste experimento foi mantida constante a razão mássica do suporte/lipase foi de 1:1, o pH 8 e a velocidade de agitação, 250 rpm do agitador orbital para cada suporte. Em

temperaturas diferentes, os valores da taxa máxima de reação ($V_{\max}$) foi obtido para determinar as energias de ativação da reação utilizando a Equação de Arrhenius.

- Efeito do pH

O efeito do pH na atividade lipolítica dos derivados foi investigado a razão mássica do suporte/lipase foi de 1:1. Foram utilizados soluções tampões nos pH 4 a 10 (100 mM) - pH 4 e 5 (tampão citrato), pH 6 a 8 (tampão fosfato de sódio) e pH 9 e 10 (tampão carbonato). Foi avaliada a estabilidade dos derivados imersos nos pH 6, 8 e 10 estocados á 5 ± 1 °C durante 45 dias.

Em todas as análises, a atividade pelo método de hidrólise do azeite de oliva foi a utilizada. Os resultados de atividade hidrolítica para velocidade de rotação do agitador orbital, temperatura e pH foram apresentados de forma relativa, de maneira que, o maior resultado obtido para cada um dos derivados equivale a 100% da atividade hidrolítica, os outros resultados apresentados são relativos a este maior valor obtido em cada análise independentemente.

3.2.4. Determinação da atividade hidrolítica da lipase

A atividade hidrolítica da lipase livre e dos imobilizados foi determinada pelo método titulométrico descrito por PADILHA *et al.* (2012; 2018). Para isso foi preparada emulsão pela mistura do azeite de oliva e solução de goma arábica (7% m/v) (1:3, v/v). Alíquotas de 2,5 mL da emulsão foram adicionadas a 1 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7) e 0,015g de lipase. A mistura foi incubada à 50°C, 250 rpm por 15 min.

Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL da mistura acetona:álcool etílico (1:1, v/v) e titulada com solução padronizada de KOH (15 mM) usando solução alcóolica de fenolftaleína como indicador ácido-base. Uma unidade de atividade da lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo livre por minuto de reação, nas condições do ensaio (50°C, pH 7, 250 rpm). A atividade foi calculada conforme Equação 1.

$$A_{lipase} (U/g) = \frac{[V_{KOH} - V_{Branco}] * M_{KOH} * 1000}{t * m} \quad (1)$$

Onde: A_{lipase} é a atividade hidrolítica, V_{KOH} é o volume de titulante gasto na amostra; V_{Branco} é o volume de titulante gasto na titulação do branco; M_{KOH} é a

concentração em mol/L da solução titulante, t é o tempo de reação e m é a massa de lipase livre/imobilizada.

3.2.5. Rendimento do imobilizado

O rendimento de imobilização foi determinado a partir dos resultados da atividade hidrolítica apresentados pela lipase livre e do derivado calculado a partir da Equação 2 (Menegatti; Znidarsic-Plazl, 2019):

$$\% \eta = \frac{A_x}{A_0} * 100 \quad (2)$$

Onde A_x é a atividade hidrolítica do derivado e A_0 é a atividade hidrolítica da lipase livre obtidos através dos resultados apresentados de determinação da atividade hidrolítica da sessão 3.2.4.

3.2.6. Caracterização físico-química

- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR): Amostras de lipase livre (antes do contato com os suportes), dos suportes puros (tratados e/ou não tratados com álcool) e dos derivados foram com espectros obtidos com 32 varreduras no comprimento de onda de 600 a 4000 cm^{-1} . O acessório ATR de seleneto de zinco com ângulo de penetração de 45° foi utilizado.
- Termogravimetria (TGA): As curvas termogravimétricas foram obtidas no modo simultâneo TG/DTA/DSC (TA Instruments - Q600), gerenciado pelo programa Thermal Advantage (V5.5.24). As massas das amostras (entre 6,5 a 7 mg) foram inseridas em cadinhos de α -alumina (25 μL) usando taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ entre 20 e 600 $^{\circ}\text{C}$. As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio a taxa de 50 $\text{ml}.\text{min}^{-1}$.
- Calorimetria exploratória diferencial (DSC): As análises foram obtidas através do equipamento Netzsch DSC 404F3 no formato Netzsch5, gerenciado pelo software Protheus. As massas das amostras entre 5 e 6,5 mg, foram inseridas em cadinhos de alumínio (25 μL), utilizando taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ entre 25 e 600 $^{\circ}\text{C}$. As análises foram realizadas sob atmosfera de argônio a taxa de 50 $\text{ml}.\text{min}^{-1}$.
- Microscopia ótica: As micrografias foram obtidas em microscópio óptico (Leica DM 2700M), com o auxílio do software Image Pro-Premier (V.9.2). O

equipamento foi operado no modo de luz incidente, campo claro com ampliação de 50 a 100 x. Para obter as distribuições e os tamanhos das partículas dos suportes foi utilizado Software Image J.

- Microscopia eletrônica de varredura (MEV): Foram utilizados dois equipamentos - Zeiss LEO 440 e 440i com detector Oxford (modelo 7060). Ambos operam com feixe de elétrons de 15 kV e respectivas intensidades de corrente de 200 pA e 50 pA. Todas as amostras foram metalizadas com ouro.
- Difractometria de raio X: Os difratogramas foram obtidos através do difratômetro de raio X Panaltical, modelo X'Pert com tubo de emissão de cobre (Cu-K α). Os parâmetros analíticos foram 2 θ inicial a 5° e 2 θ final a 80°, tempo de contagem de 15 segundos, largura de passo a 0,008°, 40 kV, 30 mA e λ de 0,15406 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo, foram utilizados seis diferentes suportes para a imobilização por adsorção física da LBc, sendo eles: poliméricos (ST-DVB, PHB, PHBV) e não poliméricos (SG, CO, CA) conforme mostra a Figura 8.

Figura 8: Suportes utilizado na imobilização da LBc: sílica gel (a), carvão ativado (b), casca de ovo (c), polihidroxibutirato (d), polihidroxibutirato-co-valerato (e) e estireno divinilbenzeno (f).



Fonte: Autoria própria.

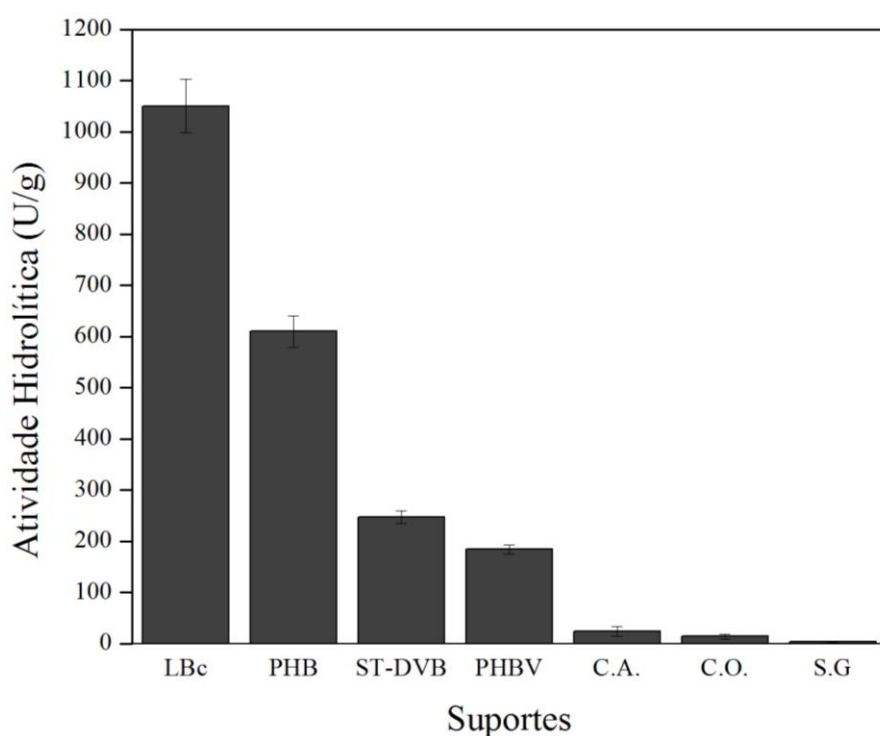
O derivado obtido através da imobilização foi caracterizado, identificando as melhores condições de hidrólise conforme metodologia descrita na Seção 3.2.4.

Dentre os suportes estudados para imobilização, os polímeros apresentaram resultados satisfatórios da atividade hidrolítica com aumento quando houve a presença de aditivos. Destaque para o PHB de 5% de PEG, seguido pelo ST-DVB com 2,5% de PEG e 0,5% de Triton X-100 e por último o PHBV na presença de 5% de PEG como mostra a Figura 9. Os resultados apresentados pelos derivados da LBc serão discutidos nas próximas seções.

4.1. Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* e pré-seleção dos suportes

O comportamento da lipase em contato com os suportes podem ser analisados conforme a Figura 9. Os derivados de PHB, ST-DVB e PHBV apresentaram maiores resultados em atividade hidrolítica, quando comparados aos suportes de SG, CO e CA.

Figura 9: Atividade hidrolítica da LBc imobilizada em PHB, PHBV, ST-DVB, SG, CA e CO comparada à lipase na forma livre (antes da imobilização).



Fonte: Autoria própria.

A baixa atividade hidrolítica apresentada pela LBc imobilizada em SG, CO e CA pode estar relacionada a metodologia adotada para imobilização, a ausência ou ineficiência das etapas de preparação do suporte antes da imobilização (Blanco *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2012; De Souza *et al.*, 2013; Markito *et al.*, 2017; Quaison *et al.*,

2019). Outro problema que pode ter ocorrido seria a lipase estar alocada profundamente no interior do poro do suporte dificultando o contato com o substrato (Sheldon; Van Pelt, 2013; Carvalho; Lima; Soares, 2014; Fabra *et al.*, 2019). Além disso, estudos relatam que uma das características importantes para eficiência e rendimento da imobilização é a afinidade hidrofílica e hidrofóbica da lipase com o suporte (Baron *et al.*, 2014; Fabra *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020).

No caso a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada apresentou melhores resultados em atividade hidrolítica quando imobilizada nos suportes que apresentam maior grau de hidrofobicidade os poliméricos (PHB, PHBV e ST-DVB) e baixos valores para os suportes com maior grau de hidrofílicidade, não poliméricos (SG, CA e CO) (Kaewthong *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019; Hunter-Sellers *et al.*, 2020; Pinto *et al.*, 2020), indicando que supostamente as características hidrofóbicas são dominantes na estrutura da lipase.

Uma vez que a hidrofobicidade do suporte e da lipase podem influenciar nos resultados de imobilização (Chernozem *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2020), foram dadas sequências as próximas etapas deste trabalho apenas os suportes poliméricos devido aos melhores resultados apresentados em atividade hidrolítica que pode estar associada a hidrofobicidade do suporte, exigindo menos etapas de preparação dos mesmos antes da imobilização, ou seja, os suportes foram utilizados como recebidos.

Ainda se tratando dos derivados de suportes poliméricos, o PHB-LBc apresentou atividade de ~ 40% e 70% maior quando comparado aos respectivos PHBV-LBc e ST-DVB-LBc. SILVA *et al.* (2014), quando imobilizaram a lipase pancreática suína em PHB associaram o alto desempenho do derivado à área superficial e a porosidade apresentada pelo suporte. YANG *et al.* (2015) utilizaram o PHB para imobilizar a lipase de *Photobacterium lipolyticum* M37 e afirmaram que a eficiência da retenção da lipase ao suporte está na quantidade de grupos funcionais apresentados em sua superfície.

Os resultados obtidos neste trabalho para o PHBV corroboram com FERNANDES *et al.* (2014) que usaram este suporte na imobilização da lipase de *Candida antarctica* B através da técnica de adsorção física. Os resultados descritos pelos autores mostraram que o derivado apresentou baixa atividade lipolítica (~ 0,33 U/g) quando comparado a lipase na forma livre (75 U/mL), porém o derivado

aumentou consideravelmente sua estabilidade térmica quando submetido a altas temperaturas em relação à lipase livre que desnaturou com o aumento da temperatura. O derivado manteve ainda 50% de sua atividade residual quando estocado a 4 °C por 30 dias.

HERNANDES, GARCIA-GALAN e FERNANDES-LA FUENTE (2011) imobilizaram também a lipase de *Candida antarctica B* usando como suporte o ST-DVB por adsorção física. O resultado de atividade hidrolítica foi inferior ao obtido neste trabalho (~55 U/g), entretanto os autores discursam que o derivado apresentou menor dessorção da lipase, o que se torna interessante na síntese de bioprodutos.

A diferença da atividade hidrolítica apresentada entre os derivados poliméricos, pode ser associada a diversos fatores, entre eles a hidrofobicidade, porosidade e o meio enzimático. Porém, quando o meio enzimático é aquoso, a hidrofobicidade pode dificultar o contato da lipase com o suporte devido a baixa molhabilidade, impedindo que haja a difusão da solução enzimática entre os canais e poros do suporte, diminuindo a área de superfície de contato e aumentando a probabilidade de lixiviação, pois as interações hidrofóbicas ocorrem apenas na superfície externa (Pinto *et al.*, 2020).

CHERNOZEM *et al.* (2019) mostraram que o PHBV apresenta menor molhabilidade que o PHB, o que indica que o suporte tenha maior grau de hidrofobicidade. Consequentemente isso pode ter levado a baixa imobilização causando o menor desempenho na atividade hidrolítica. ROUXHET *et al.* (1998) mostraram que quando utilizado o PHBV para adsorver algumas macroproteínas sua alta hidrofobicidade repelia as mesmas. Para diminuir o grau de hidrofobicidade do polímero foi modificado através da hidrólise alcalina aumentando as concentrações superficiais de -COOH o que levou ao aumento da hidrofilicidade do polímero, sendo possível a adsorção das proteínas.

Outros solventes com maior grau de hidrofobicidade podem ser utilizados para dissolver a lipase, facilitando a difusão da solução nos suportes hidrofóbicos e garantindo as interações entre o suporte e a lipase, aumentando a carga de lipase adsorvida. O problema do uso de outros solventes está muitas vezes no alto valor, que onera o processo e pode causar alterações químicas nas lipases (Rouxhet *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2007; Chernozem *et al.*, 2019).

BLANCO *et al.* (2007) utilizaram soluções com diferentes concentrações de etanol (v/v) para imobilizar a lipase de *Candida antarctica B* em sílica MS3030. O aumento do etanol no meio aumentou a retenção de lipase no suporte devido as interações hidrofóbicas, mas os derivados obtidos em altas concentrações de etanol apresentaram atividade hidrolítica inferior ao derivado obtido na ausência do etanol, pois o etanol pode ter causado mudanças químicas do sítio ativo diminuindo ou inativando a atividade da lipase.

Neste trabalho foi utilizada apenas água como solvente, devido suas propriedades satisfatórias, não modificando a composição química da lipase, disponibilidade em abundância, baixo custo e facilidade de operação. Os suportes PHB, PHBV e ST-DVB após a imobilização, foram caracterizados afim de obter a melhor condição de atividade hidrolítica. Na sequência foram utilizados aditivos na imobilização da LBc como descrito na sessão 3.2.2, com o objetivo de minimizar os efeitos negativos do grau de hidrofobicidade e o meio enzimático, com o intuito de aumentar a retenção de lipase ao suporte e a atividade hidrolítica.

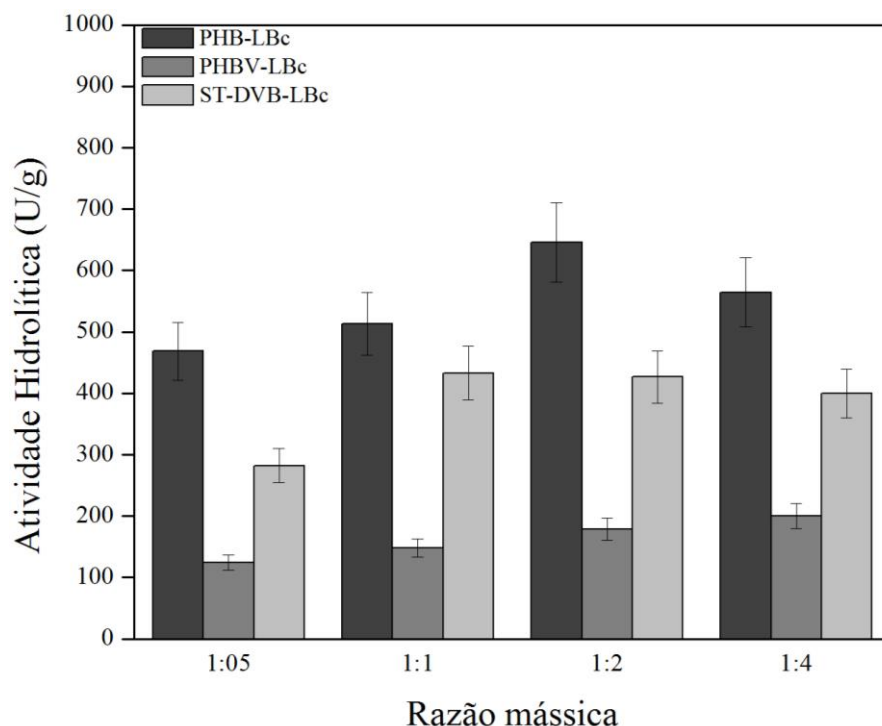
4.2.Caracterização dos derivados PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc

Os derivados foram caracterizados com o propósito de obter os melhores resultados de atividade hidrolítica. Para isso, as seguintes condições foram analisadas: carregamento de lipase no suporte, velocidade do agitador orbital, temperatura e pH. Cada análise será discutida separadamente nos itens a seguir.

4.2.1. Razão mássica

Primeiramente foi avaliado o efeito da razão suporte-LBc nas razões de 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:4 (m/m), como mostra a Figura 10. O comportamento da LBc imobilizada em PHB apresentou aumento gradativo na atividade hidrolítica a medida que aumentou o carregamento de lipase, atingindo seu melhor resultado na razão 1:2 ($g_{\text{suporte}}:g_{\text{lipase}}$). Com o aumento do carregamento de enzima de 1:2 para 1:4 ($g_{\text{suporte}}:g_{\text{lipase}}$), houve decréscimo de ~15% na atividade. Comportamento similar foi apresentado pelo derivado de ST-DVB-LBc, com melhores resultados para a razão 1:1($g_{\text{suporte}}:g_{\text{lipase}}$), diminuindo a atividade a medida que aumentou a carga de lipase.

Figura 10: Atividade hidrolítica em função da razão mássica (suporte:lipase) para os suportes: PHB, PHBV e ST-DVB.



Fonte: Autoria própria.

Uma possibilidade a esse comportamento são os problemas difusionais encontrados pela lipase devido a saturação no suporte, fazendo com que a mesma não encontrasse espaço para se ligar, levando ao processo contrário de adsorção, a dessorção. A dessorção devido a alta carga inicial de lipase foi observada por RAMOS *et al.* (2015) imobilizando a lipase de *Geothichum candidum* em PHB, que diminuiu a atividade hidrolítica na medida que houve aumento na carga de lipase no momento da imobilização.

Outra possível ocorrência é a formação de multicamadas, inativando as primeiras camadas de lipase no suporte, diminuindo sua atividade hidrolítica. As interações hidrofóbicas da lipase com o suporte mantem o sítio ativo exposto ao substrato, mantendo a tampa protetora *lid* na conformação aberta, conhecido como ativação interfacial. Quando formadas camadas superiores, essas por sua vez, não possuem acesso ao suporte, a falta das interações hidrofóbicas, pode causar a imobilização da lipase em sua conformação fechada e impedindo que o substrato entre em contato com a primeira camada que possui ativação interfacial diminuindo a atividade hidrolítica do derivado (De Oliveira; Alves; de Castro, 2000; Gao *et al.*, 2009).

Para o derivado PHBV o aumento do carregamento de lipase em relação ao suporte, não proporcionou aumento expressivo da atividade hidrolítica, comparado aos outros suportes. No trabalho realizado por CABRERA-PADILHA *et al.* (2012), foi avaliado o carregamento de lipase de *Candida rugosa*, imobilizada por adsorção física, no PHBV. Os resultados mostraram que o aumento da razão lipase-suporte de 0,15 para 0,3, m/m, melhoraram a atividade hidrolítica. Entretanto, acima deste valor, a atividade permaneceu constante. O derivado mostrou maior resistência à mudança de temperatura, isto é um importante indicativo para aplicações práticas da lipase imobilizada em PHBV.

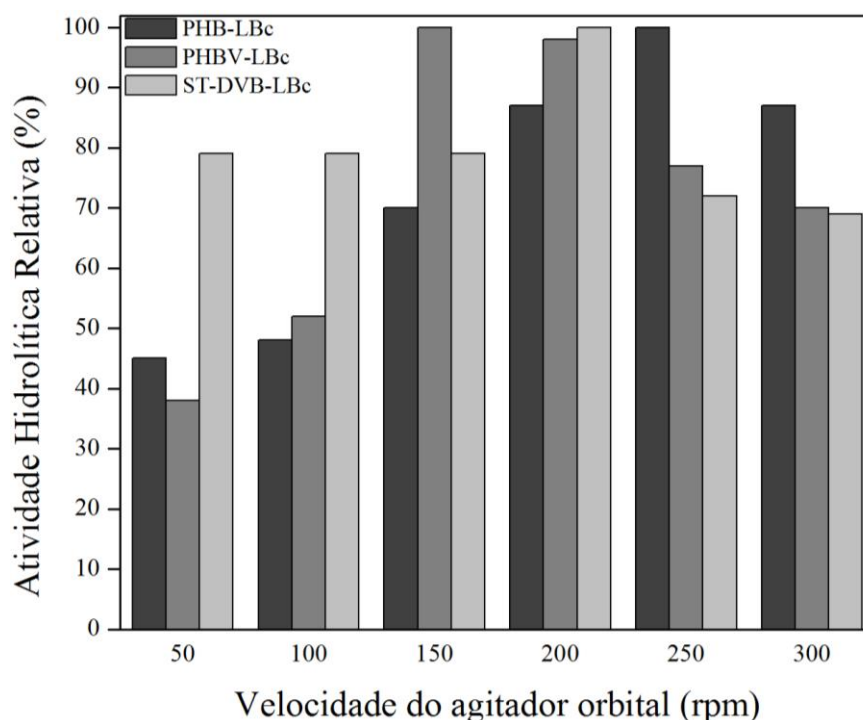
Os resultados exibidos para o carregamento da LBc foram diferentes em cada suporte polimérico. Desta forma foi mantida a proporção de 1:1, m/m, independente do suporte utilizado, devido ao alto custo da LBc e para manter a viabilidade das reações subsequentes em termos comparativos.

4.2.2. Efeito da velocidade do agitador orbital

A ação da velocidade do agitador orbital sob a lipase após ser imobilizada foi avaliada, verificando se diferentes velocidades podem influenciar nos resultados de atividade hidrolítica de cada derivado obtido. Foram avaliadas as velocidades de agitação de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 rpm. Os resultados obtidos na Figura 11 mostram que os derivados apresentaram diferentes comportamentos sob a ação da velocidade do agitador orbital. Os resultados de atividade hidrolítica foram apresentados de forma relativa, de maneira que, o maior resultado obtido na análise equivale a 100% em atividade hidrolítica, os outros resultados apresentados são relativos ao maior resultado obtido, para cada um dos derivados.

O PHB-LBc apresentou melhoria em termos de atividade hidrolítica na medida que houve aumento da velocidade de rotação do agitador, até atingir 250 rpm, a partir de então houve diminuição no rendimento do derivado. O PHBV-LBc apresentou comportamento semelhante ao PHB-LBc, porém, com melhor desempenho em atividade hidrolítica a 150 rpm. Já o derivado de ST-DVB-LBc não apresentou diferenças significativas nas três primeiras velocidades estudadas, com variação e melhor rendimento em 200 rpm, seguido de diminuição da atividade hidrolítica nas velocidades subsequentes.

Figura 11: Atividade relativa em função da velocidade de rotação do agitador orbital.



Fonte: Autoria própria.

A isenção ou baixa velocidade impossibilita ou dificulta a difusão entre os reagentes, levando ao baixo desempenho do catalisador, em contraste, quando a agitação é excessiva pode levar rapidamente uma alta quantia de substrato até a lipase imobilizada, ao mesmo tempo retirá-los, sem que haja tempo de ocorrer a conversão em produto, além disso, pode ocorrer a desnaturação ou lixiviação da lipase (Said; Pietro, 2004; Raghavendra *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015).

De maneira análoga, os derivados da LBc apresentaram menor desempenho em atividade hidrolítica a baixas velocidades de 50 e 100 rpm. Quando houve o aumento da agitação foi possível identificar a região de melhor eficiência de cada um dos derivados, até atingir seu limite onde diminuíram os valores em atividade hidrolítica. O PHBV-LBc apresentou melhor desempenho a 150 rpm, que pode estar relacionado com a probabilidade da maior carga de lipase adsorvida estar presente na superfície externa e com o aumento da velocidade pode ter ocorrido a lixiviação e desnaturação da lipase. Já para o ST-DVB-LBc e PHB-LBc apresentaram velocidades intermediárias, de 200 e 250 rpm, respectivamente, esse resultado pode estar relacionado a maior difusão do substrato, que ao exceder essas velocidades, pode ter diminuído o tempo de contato com a lipase, diminuindo a atividade hidrolítica.

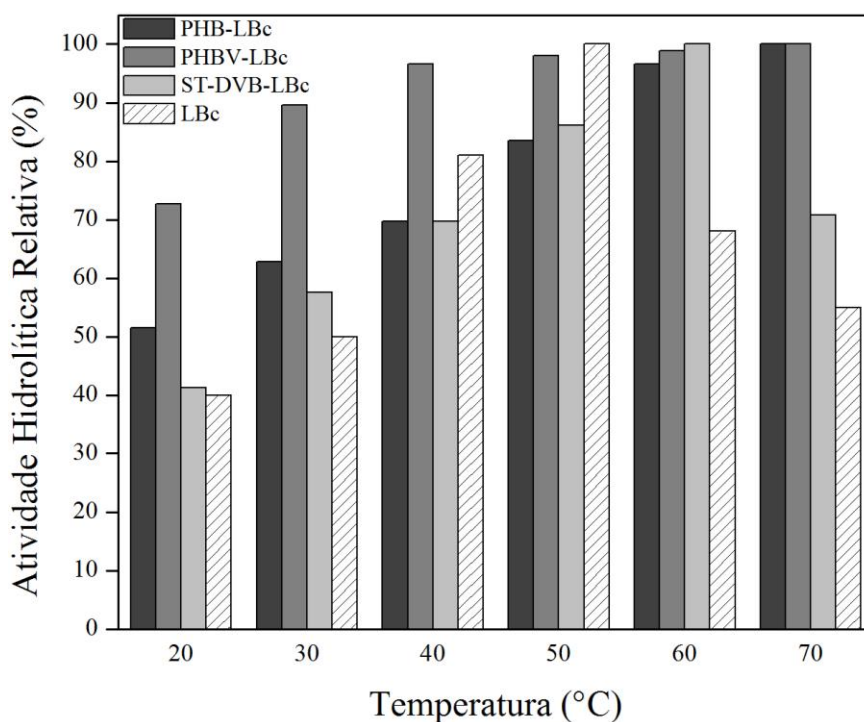
Esta observação foi utilizada para que fosse possível determinar a zona de segurança de processo, ou seja, a velocidade de rotação do agitador no qual o derivado de LBc apresentasse melhor desempenho, sem que ocorra rompimento do suporte, lixiviação ou inativação da lipase.

4.2.3. Efeito da temperatura

A temperatura ideal de processo para os derivados de LBc foi determinada verificando a atividade hidrolítica relativa em 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °C. Com base nos resultados da Figura 12, é possível observar que os suportes proporcionaram estabilidade térmica em maiores temperaturas para a lipase imobilizada, visto que em sua forma livre a temperatura ótima de atividade hidrolítica relativa foi a 50 °C.

O derivado de PHBV-LBc apresentou pouca variação da atividade hidrolítica relativa acima de 40 °C, com maior desempenho a 70 °C. O derivado de PHB-LBc apresentou comportamento quase que linear, em atividade hidrolítica relativa com o aumento da temperatura, apresentando melhor resultado a 70 °C. Já o derivado ST-DVB-LBc apresentou maior atividade hidrolítica a 60 °C, seguida da diminuição em rendimento de ~30% para ~70°C.

Figura 12: Atividade relativa em função das diferentes temperaturas.



Fonte: Autoria própria.

A maior tolerância térmica da lipase imobilizada pode ter sido obtida devido aumento da estabilidade proporcionado pelo suporte, diminuindo a flexibilidade da lipase impedindo o desdobramento da estrutura terciária responsável pela atividade, evitando a desnaturação por calor (Cruz *et al.*, 2010; Sheldon; Woodley, 2018). A similaridade entre as temperaturas ótimas para LBc imobilizada em PHB e PHBV, podem estar relacionadas as características da família dos PHA's, porém a lipase imobilizada pode apresentar resistência térmica diferente para cada tipo de suporte, relacionadas com as interações ocorridas durante a imobilização, quantidades de grupos funcionais, tipo de substrato e características físicas de casa suporte (Hara; Hanefeld; Kanerva, 2008; De Souza *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2019).

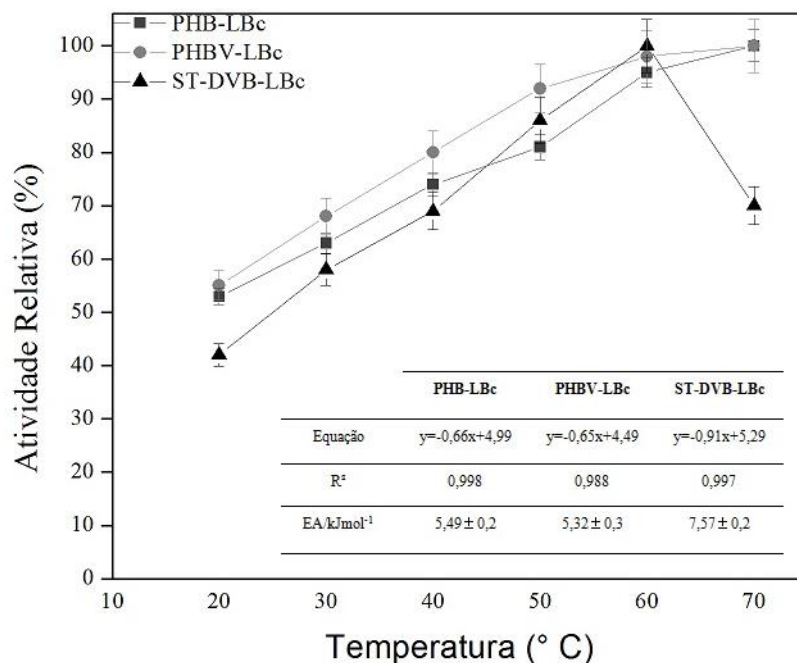
HRYDZIUSZKO *et al.* (2019) imobilizaram a LBc em acrílico, sílica e celulose por adsorção física e verificaram que os suportes proporcionaram maior estabilidade térmica até 70 °C. De forma análoga aos resultados obtidos neste trabalho para os derivados PHB-LBc e PHBV-LBc. O uso do suporte de ST-DVB na imobilização das lipases de *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica* proporcionou desempenho satisfatório em temperaturas superiores aos da lipase livre (De Oliveira; Alves; De Castro, 2000; Dizge, 2009; Hernandez; Garcia-Galan; Fernandez-Lafuente, 2011), foi observado mesmo comportamento para lipase de *Burkholderia cepacia* que em sua forma livre apresentou maior desempenho em 50 °C e após a imobilização em ST-DVB passou para 60°C.

Não foi de interesse nesse projeto analisar temperaturas acima de 70 °C, pois a maioria das reações envolvendo lipases costumam ser em temperaturas brandas, pois o aumento da temperatura pode causar perda da atividade hidrolítica por absorver excesso de energia e causar rompimento da estrutura terciária, onde se encontra o sítio ativo, e consequente desativação da enzima. Por isso, a temperatura é uma condição crítica no meio reacional (Gomes *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2019).

A energia de ativação foi obtida a partir da equação de Arrhenius, onde através dos resultados da hidrólise do azeite de oliva em função da temperatura foi possível construir um gráfico para obtenção dos parâmetros cinéticos mostrados pela Figura 13, que possibilitou a identificação da taxa de energia necessária para conversão de um dado substrato em produto (Rehman *et al.*, 2017). Através dos valores obtidos da energia de ativação, podemos observar que a lipase possui maior afinidade com os suportes de PHB e PHBV com energia de ativação de $5,49 \pm 0,2$

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $5,32\pm 0,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Para o derivado de ST-DVB-LBc a energia de ativação foi de $7,57\pm 0,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ maior que para os outros dois polímeros.

Figura 13: Energia de ativação para os derivados PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc.



Fonte: Autoria própria.

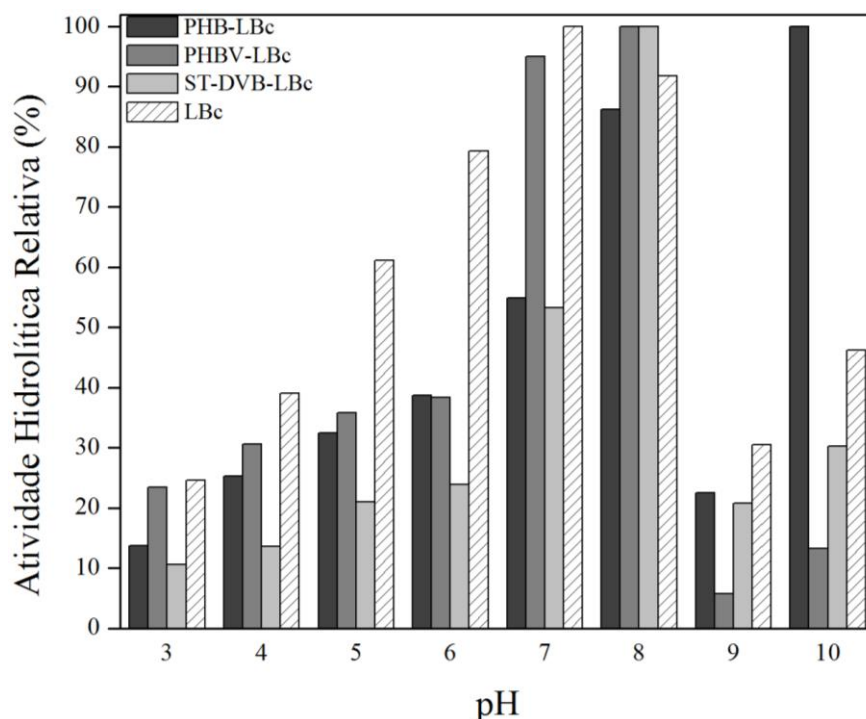
Porém mesmo a maior energia de ativação para o ST-DVB, os três suportes apresentaram resultados satisfatórios, quando comparados a outros suportes utilizados na imobilização da LbC: alginato de sódio $18,04 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, matriz polimérica a base de hidroxipropil metilcelulose e matriz álcool polivinílico $44,68 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, polipropileno $20,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Pencreac'h; Baratti, 1999; Mathpati; Badgujar; Bhanage, 2016; Moreira *et al.*, 2019).

4.2.4. Efeito do pH

A Figura 14 mostra o influência do pH no desempenho da lipase livre e imobilizada na hidrólise do azeite de oliva. A lipase livre apresentou aumento gradativo da atividade hidrolítica conforme foi aumentando o valor do pH de 3 até atingir valor de pH neutro 7, em seguida houve a diminuição da atividade nos pHs mais básicos (pH 8 ~10%) e queda acentuada no pH 9 de ~70%, entretanto aumento da atividade em pH 10 de ~15% foi observado. Os derivados poliméricos da LbC apresentaram comportamento semelhante aos da lipase livre em pH ácido e básico,

porém com maior rendimento em pH 8, tendendo ao meio básico para os derivados PHBV e ST-DVB, já o derivado de PHB apresentou melhor resultados em pH 10.

Figura 14: Atividade relativa em função de diferentes valores de pH para a lipase na forma livre e imobilizada.



Fonte: Autoria própria.

O tipo do sal utilizado na obtenção da solução tamponada e a quantidade específica de íons presentes no meio tamponado podem proporcionar o aumento da atividade hidrolítica da lipase, pois podem interagir com grupos dipolares, ligações peptídicas, grupos amino, carboxila, hidroxila e aminoácidos (Triantafyllou *et al.*, 1997).

Desta forma, uma possibilidade que levou o aumento da atividade hidrolítica pode estar relacionada às *lids* da lipases que não interagiram com a superfície do suporte e formaram camadas superiores, cobrindo assim o sítio ativo. Possivelmente, o carregamento de lipase que foi imobilizada, mas ficaram parcialmente com o sítio ativo exposto, pode ter sido influenciado pelo efeito dos íons livres presente na solução com pH 10, causando a movimentação dessa estrutura fazendo com que a tampa protetora abrisse, proporcionando o aumento da atividade hidrolítica da lipase livre e dos derivados, com resultados expressivos, como observou-se para o PHB.

Os resultados estão de acordo com os descritos por PADILHA *et al.* (2012) referente ao efeito da atividade hidrolítica em pH 10, que apresentou ligeiro aumento quando comparado ao pH 9, para a lipase extraída da cepa de *Burkholderia cepacia*. RATHI, SAXENA e GUPTA (2001) obtiveram a lipase de *Burkholderia cepacia* a partir de óleo de mostarda. O pH ótimo da lipase foi em 7, no pH 8 a lipase teve minimização da atividade e esta foi recuperada em pH 10, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

OZMEN e YLMAZ (2009) na imobilização da lipase de *Candida rugosa* em polímero de β -ciclodextrina por reticulação com diisocianato de hexametileno observaram comportamento semelhante ao deslocamento do valor o pH da lipase na forma livre e na imobilizada. A lipase imobilizada apresentou deslocamento da atividade ótima do pH neutro (pH 7 – lipase na forma livre) para o levemente alcalino (pH 8 – lipase imobilizada). A lipase se liga à matriz polimérica por meios dos grupamentos aminas, desta forma, os autores discursam que após a imobilização, ocorreu aumento na quantidade dos grupos ácidos e a lipase ficou com caráter polianiónico.

Devido a isso, o gradiente de pH entre as partículas de lipase e a solução externa ocorre durante a hidrólise enzimática, resultando em valores de pH mais alcalinos. Em geral, as lipases são produzidas em pH neutros para alcalinos pois a LBc possuem pH ótimo nestas mesmas faixas. Os resultados mostram que as condições mais amenas (próximas do pH neutro) mantêm melhor a manutenção da atividade enzimática, e isto é um importante parâmetro quando submetidas aos processos de biotransformações (Ozmen; Ylmaz, 2009).

O derivado de PHB-LBc apresentou maior atividade hidrolítica em pH 10, porém tomamos como pH 8 o ideal, sendo seu segundo melhor resultado, devido instabilidade da estrutura da lipase em pHs muito alcalinos. Os íons presentes em solução de alta alcalinidade pode tornar instável a conformação da estrutura da lipase imobilizada e assim alterar os valores de rendimento, portanto utilizar valores de pH próximo ao pH neutro pode apresentar maior segurança quanto a conformação da lipase (Triantafyllou *et al.*, 1997; Padilha *et al.*, 2012).

Foram analisadas a estabilidade dos derivados nos pHs 6, 8 e 10. Para fins comparativos foi tomada como 100% a atividade hidrolítica medida no instante que foram adicionados os derivados nas soluções tamponadas e foram medidas as atividades relativas a este valor durante 45 dias. Na Tabela 4 podemos observar que após 45 dias o suporte de ST-DVB foi o que proporcionou maior estabilidade para a LBc nos pHs analisados, mantendo a atividade da lipase acima de 60% para todos analisado. Podemos observar que o suporte de PHB proporcionou alta resistência a lipase em pH 6 com $89\pm4\%$, seguido de $66\pm4\%$ em pH 8, comparadas a atividade relativa inicial. Já em pH 10, o suporte de PHB proporcionou baixa estabilidade para a lipase, perdendo cerca de 57% da atividade inicial. O suporte de PHBV não mostrou estabilidade da lipase em nenhum dos pH analisados.

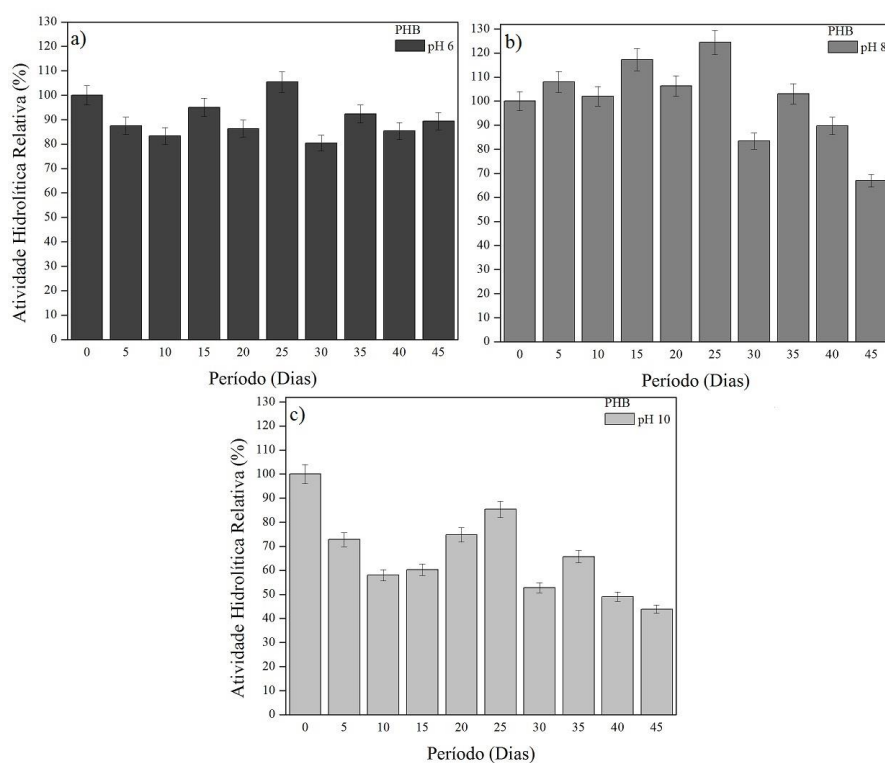
Tabela 4: Tabela de atividade hidrolítica relativa da estabilidade em pH 6, 8 e 10 dos derivados de PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc após 45 dias de incubação.

	PHB-LBc	PHBV-LBc	ST-DVB-LBc
	%		
pH 6	89 ± 4	40 ± 5	69 ± 5
pH 8	66 ± 4	32 ± 5	74 ± 4
pH 10	43 ± 6	31 ± 5	62 ± 4

Fonte: Autoria própria.

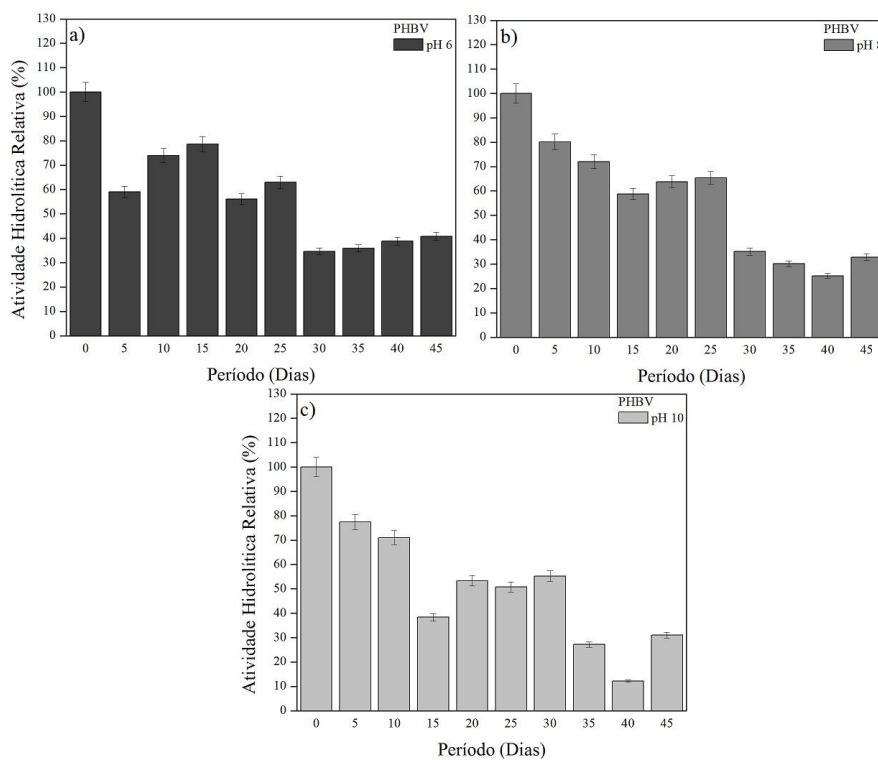
Nas Figuras 15, 16 e 17 podemos observar o comportamento dos derivados ao longo do período de análise. Os suportes apresentaram resultados não lineares seguida de queda na atividade hidrolítica relativa. A Figura 15 mostra que o suporte de PHB, dentre os estudados, foi o que proporcionou menor oscilação nos resultados de atividade hidrolítica relativa durante toda análise, apresentando queda da atividade hidrolítica relativa mais considerável a partir do 25º dia, o mesmo comportamento foi apresentado pelo suporte de ST-DVB (Figura 17). Para o PHBV, como mostra a Figura 16, em pH 10 o derivado apresentou estabilidade entre 20 e 30 dias, seguido de perda decrescente da atividade hidrolítica relativa a partir do 35º dia.

Figura 15: Comportamento do derivado de PHB-LBc na estabilidade em pH (a) 6, (b) 8 e (c) 10.



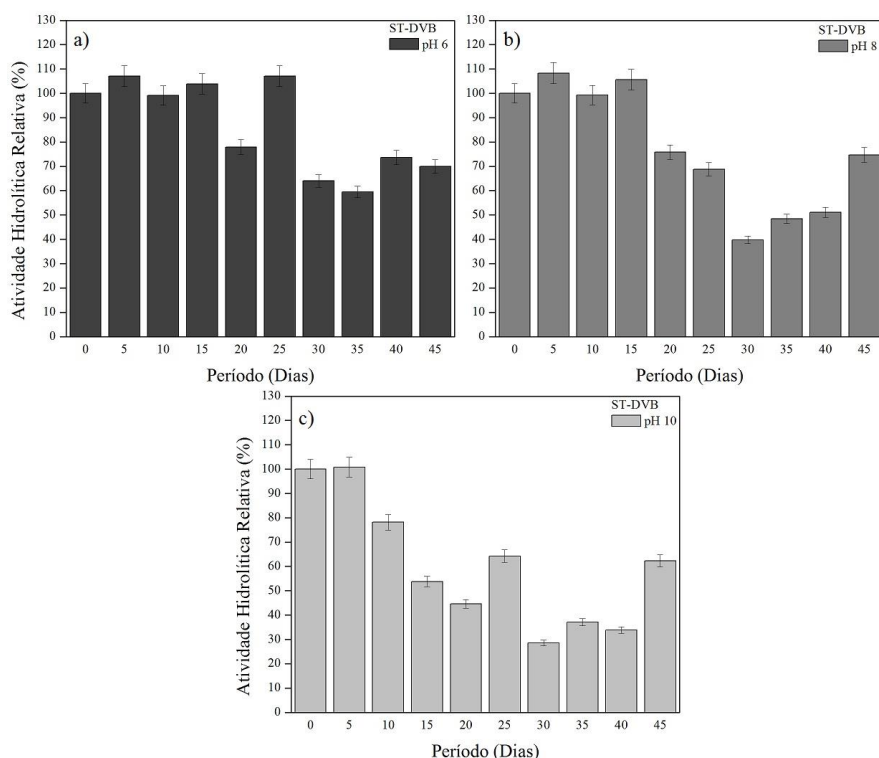
Fonte: Autoria própria.

Figura 16: Comportamento do derivado de PHBV-LBc na estabilidade em pH (a) 6, (b) 8 e (c) 10.



Fonte: Autoria própria.

Figura 17: Comportamento do derivado de ST-DVB-LBc na estabilidade em pH (a) 6, (b) 8 e (c) 10.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com BINHAYEEDING et al., (2020), a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em PHB apresentou comportamento semelhante ao da LBc neste trabalho, mantendo sua atividade hidrolítica relativa em 80% depois de 30 dias armazenada em pH 7, após esse período a lipase diminuiu sua atividade até chegar a 50% em 60 dias. Isso indica que a adsorção proporciona múltiplas ligações entre a lipase e o suporte levando a maior estabilidade da lipase evitando sua mudança na estrutura, tornando a lipase mais rígida o que explica a efetividade na estabilidade da LBc nos suportes de PHB e ST-DVB (Chen et al., 2020).

A baixa estabilidade apresentada pelo suporte de PHBV em diferentes pHs para LBc, pode estar relacionada a sua alta hidrofobicidade. A eficiência na estabilidade da lipase está relacionada as diferentes interações e múltiplas ligações que a lipase faz com o suporte durante a imobilização. A superfície hidrofóbica do suporte pode ter causa a repulsão da solução aquosa de lipase, levando a baixa interação entre a estrutura da lipase e do suporte, fazendo com que haja poucas partes da lipase interagindo com a estrutura do suporte, facilitando a desnaturação ou a movimentação de sua estrutura que pode levar a movimentação da tampa protetora do sítio ativo inativando-o (Chernozem et al., 2019; Binhayeeding et al., 2020).

4.3. Estudo da influência do uso dos aditivos

De acordo com a proposta da Tabela 5, foi estudada a influência de cada aditivo individualmente e na sequência foi proposta a combinação entre os mesmos, com o intuito de observar melhorias quando estão presente simultaneamente na imobilização por adsorção física. O derivado de PHB-LBc e PHBV-LBc apresentou maior atividade hidrolítica na presença de 5% PEG e o ST-DVB-LBc na presença de 2,5% de PEG e 5% de TX.

Tabela 5: Tabela de ensaios dos aditivos GA, PEG e TX individuais e suas combinações.

Ensaio	GA %	PEG %	TX %	At. PHB (U/g)	At. PHBV (U/g)	At. ST-DVB (U/g)
1	0	5	0	917±20	200±10	402±10
	0	0	10	777±18	80±11	818±22
	2,5	0	0	628±32	71±4	116±10
2	2,5	0	10	476±23	146 ±7	93±5
	1,25	0	5	503±25	173±8	76±4
3	2,5	5	0	744±37	41±2	32±2
	1,25	2,5	0	678±35	77±4	25±2
4	0	5	10	718±35	13±0,7	836±41
	0	2,5	5	642±32	73±4	901±45
5	2,5	5	10	771±38	5±0,3	45±3
	1,25	2,5	5	851±42	124±7	51±4
6	0	0	0	608±15	183±9	247±12

Fonte: Autoria própria.

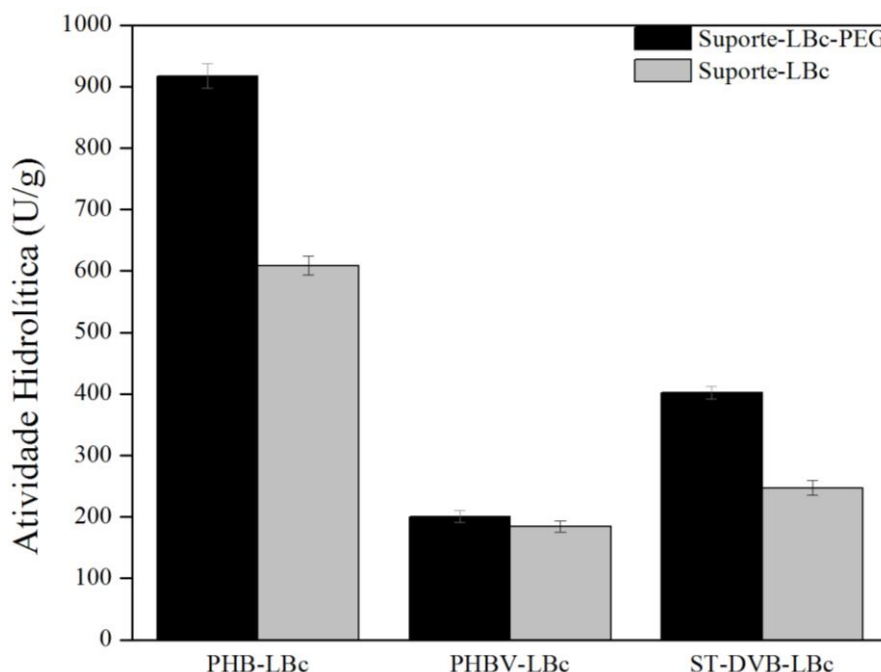
O PHB apresentou melhor desempenho como suporte para LBc na maioria dos ensaios realizados. Já o PHBV demonstrou comportamento contrário ao PHB, com resultados inferiores na presença dos aditivos na maioria dos ensaios realizados. O suporte de ST-DVB após a adição dos aditivos apresentou melhorias significativas em atividade hidrolítica. A seguir serão detalhados e discutidos seus resultados separadamente.

4.3.1. Influência do polietilenoglicol 1500 (PEG)

Na Figura 18 são apresentados os resultados na imobilização da LBc nos suportes poliméricos com uso de PEG a 5% (m/v), a concentração escolhida foi com base no estudo apresentado por SOARES *et al.* (2002). Analisando a influência do aditivo, os derivados PHB-LBc e ST-DVB-LBc apresentaram melhoria na retenção da lipase aos suportes, com aumento de ~35 % e ~38 %, respectivamente. Entretanto, o derivado PHBV-LBc apresentou insignificativo aumento da atividade hidrolítica, não

havendo melhoras representativas na presença do aditivo como para os outros dois suportes.

Figura 18: Atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos suportes poliméricos PHB, PHBV e ST-DVB na ausência e presença de PEG1500 à 5%.



Fonte: Autoria própria.

O desempenho na imobilização da LBc em contato com o PEG nos suportes poliméricos pode estar atrelado a diversos fatores: formação de braços ligando o suporte e a lipase, as características de equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas do aditivo promove a interação com o suporte causando a ativação da lipase, devido às interações hidrofóbicas, aumento da viscosidade do meio que pode auxiliar na molhabilidade dos suportes hidrofóbicos e a proteção a dos efeitos da desnaturação (Soares *et al.*, 2002; Perna *et al.*, 2017).

A efetividade do aditivo nos suportes poliméricos deste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por SOARES *et al.* (2002) fazendo uso de PEG 1500 na imobilização da lipase de *Candida rugosa* em suportes de sílica com porosidade controlada, o aditivo influenciou no aumento expressivo em rendimento de imobilização, tempo de meia vida, atividade hidrolítica e na esterificação. ADLERCREUTZ (2013) mostrou que a presença do PEG impede a inativação da enzima durante a adsorção física.

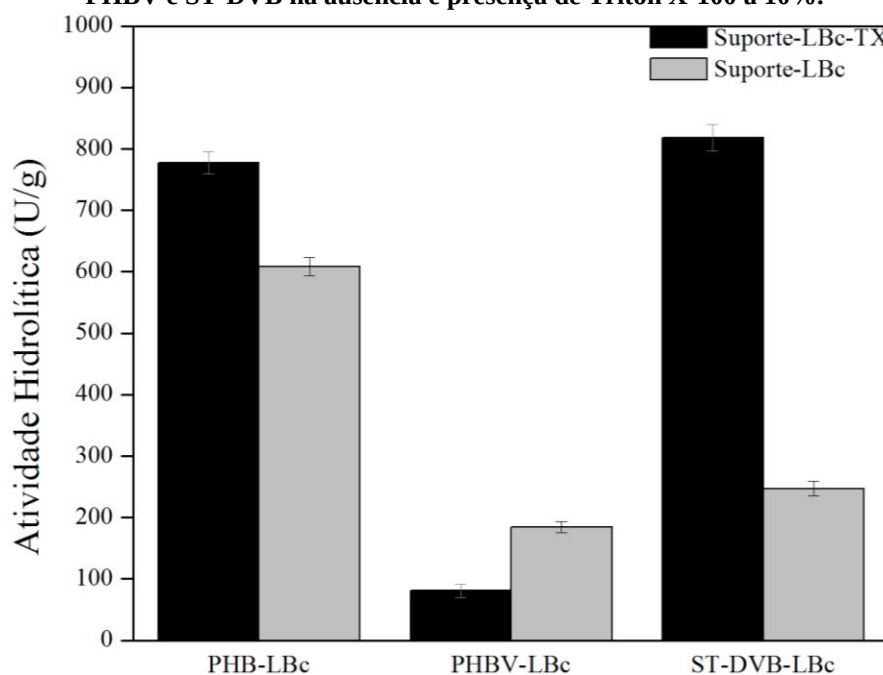
CIPOLATTI *et al.* (2015) discursaram que a principal função do PEG é aumentar a resistência mecânica das partículas de polímero aos suportes. Esta

confirmação pode ser observada no estudo de Vilas Bôas *et al.* (2018), que utilizaram PEG 1500 durante a imobilização por adsorção física da lipase de *Rhizopus oryzae* usando como suportes polisiloxano-hidroxietilcelulose (SIO₂-HEC) e Diaion HP-20 (ST-DVB) na síntese do laurato de isoamila em reator de fluxo contínuo onde o catalisador apresentou produtividade significativa e estabilidade durante vários ciclos.

4.3.2. Influência do Triton X-100 (TX)

A influência do tensoativo TX com concentração de 1% (v/v) na imobilização da LBc em suportes poliméricos, foi analisada com bases no trabalho de DE OLIVEIRA *et al.* (2018), conforme mostra a Figura 19. O aditivo foi adicionado em pequena concentração à solução contendo carregamento de lipase e os resultados de imobilização mostraram significativa melhora na atividade hidrolítica quando comparados aos derivados na ausência do TX, de ST-DVB-LBc 247±12 U/g para 818±22 U/g (aumento de 3,3x da atividade hidrolítica) e PHB-LBc de 608±15 U/g para 777,4±18 (~22% aumento de atividade). Em contrapartida os resultados para o derivado de PHBV não foram satisfatórios apresentando diminuição de ~56% na atividade hidrolítica.

19: Atividade hidrolítica absoluta (U/g) da lipase imobilizada nos suportes poliméricos PHB, PHBV e ST-DVB na ausência e presença de Triton X-100 à 10%.

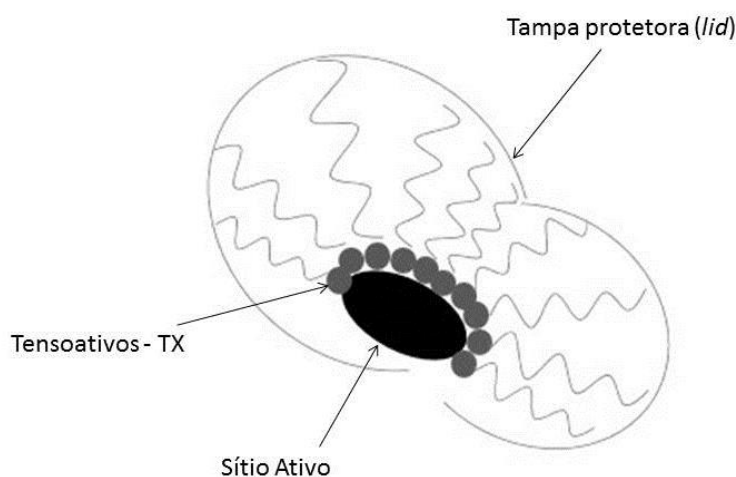


Fonte: Autoria própria.

PERNA *et al.* (2017) imobilizou a lipase de *Candida Rugosa* em suportes de glyoxyl-agarose na presença de Triton X-100 e obteve aumento da atividade

hidrolítica devido a possível mudança do equilíbrio conformacional da lipase devido a presença das micelas formadas pelo tensoativo. De acordo com SYCHEV, BARSUKOV e IBANOV (2013) as moléculas de TX tendem a se aglomerar (~100 moléculas) formando grandes micelas, o mesmo pode ter levado ao aumento da atividade hidrolítica nos derivados de PHB-LBc e ST-DVB-LBc. De maneira análoga as moléculas do tensoativo interagem com o sítio ativo hidrofílico formando uma espécie de micela, protegendo-o enquanto a calda hidrofóbica interage com as tampas da lipase, mantendo-as afastadas durante a imobilização. A Figura 20 sugere o que pode ocorrer com a enzima na presença do tensoativo.

Figura 20: Esquema da possível interação do tensoativo com a lipase impedindo a movimentação da tampa protetora.



Fonte: Autoria própria.

Como a estrutura do PHBV é mais hidrofóbica, o tensoativo não proporcionou nenhuma vantagem a imobilização, a possível mudança da conformação da estrutura da lipase ou a presença do tensoativo na solução enzimática, pode ter impedido a interação com o suporte, diminuindo a área disponível de contato e impedindo as interações hidrofóbicas do suporte com a lipase.

A complexidade dos arranjos conformacionais presentes nas lipases pode alterar o seu estado de ativo (tampa aberta) para inativo (tampa fechada). A LBc em contato com meio aquoso pode levar ao movimento na hélice $\alpha 5$, presente em sua estrutura, o qual impulsiona o movimento da $\alpha 9$ que as aproximam fazendo com que haja a interação hidrofóbica entre as duas partes, cobrindo o sítio ativo da enzima. Os tensoativos interagem com o sítio ativo da lipase durante a imobilização, evitando que

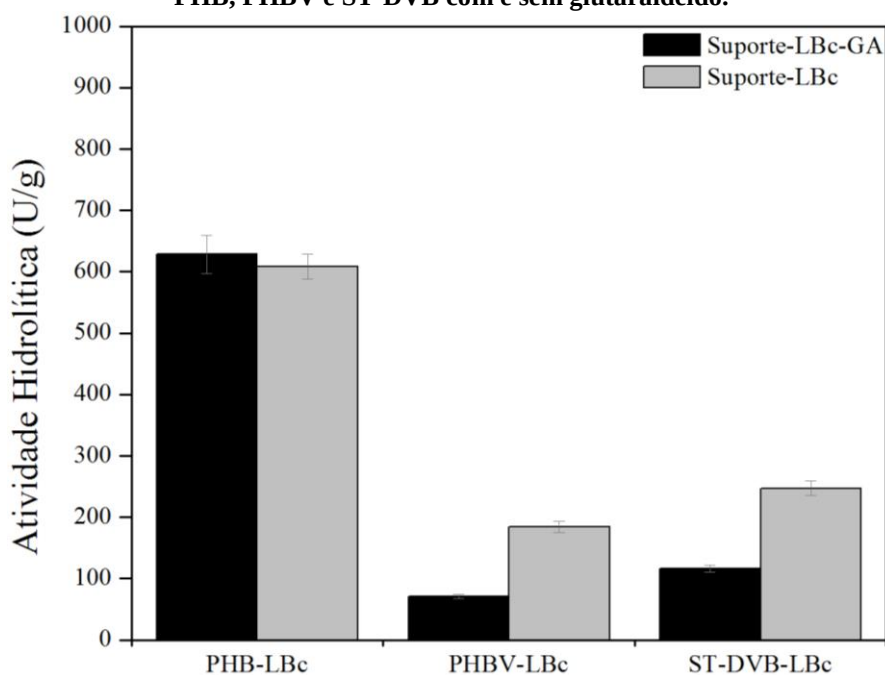
a tampa protetora o cubra fazendo com que a lipase seja imobilizada em sua forma ativa, ou seja, os grupos funcionais que antes estavam cobertos, tornam-se expostos, o que favorece o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, aumentando significativamente a atividade hidrolítica nos derivados (Barbe *et al.*, 2009).

MESA *et al.* (2018) estudaram o comportamento estrutural e catalítico da lipase de *Thermomyces lanuginose* (TLL) na presença de Triton X-100 em diferentes pHs. Os resultados mostraram que o surfactante auxiliou no ajuste da enzima ao substrato, influenciando positivamente na atividade e a estabilidade do biocatalisador.

4.3.3. Influência do glutaraldeído (GA)

O comportamento dos derivados utilizando GA durante a imobilização da LBc está ilustrado na Figura 21. A concentração de 2,5 % (v/v) foi escolhida com base no trabalho desenvolvido por PAHUJANI *et al.* (2008). Os derivados PHBV e ST-DVB apresentaram redução maior a 50% dos valores de atividade hidrolítica quando o GA foi adicionado para ativação dos suportes. Apenas o PHB apresentou mudança pouco expressiva (~3%) na atividade quando comparada a lipase imobilizada sem o uso do aditivo.

Figura 21: Atividade hidrolítica absoluta (U/g) da lipase imobilizada nos suportes poliméricos PHB, PHBV e ST-DVB com e sem glutaraldeído.



Fonte: Autoria própria.

O protocolo de imobilização utilizado nesse trabalho pode estar relacionado ao baixo desempenho dos derivados com o uso do GA, por exemplo, geralmente os

suportes possuem grupos aminos primários ou passam por algum processo de aminação da superfície, o qual não foi realizado nos suportes estudados nesse trabalho. Nestas etapas o GA faz ligações com grupos aminos primários da lipase e do suporte, servindo como um braço de ligação (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1993; Betancor *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2012a)

O tempo de imobilização também pode afetar diretamente o desempenho da lipase, quando em excesso, pode causar ligações indesejáveis com agrupamentos aminos da estrutura da lipase, que pode levar a mudança de sua estrutura. Outra possibilidade é a interação do GA com os grupos aminos do sítio ativo da lipase, região onde ocorre a catalise, mudando a estrutura da lipase podendo inativar ou diminuir seu desempenho (Barbosa *et al.*, 2012a).

Segundo RIOS *et al.* (2018), os grupamentos presentes no glutaraldeído reagem com os grupamentos presentes nos polímeros, que quando ativados reagem com os grupamentos amina presentes na lipase, produzindo a base de Schiff (C=N) o que ocasiona melhora na estabilidade da lipase no suporte. O glutaraldeído pode causar a diminuição da atividade hidrolítica da lipase porem proporciona a formação de ligações mais fortes, desta forma durante o processo de síntese do bioproduto, as perdas da lipase por lixiviação ou arraste são minimizadas, devido a sua maior estabilidade, possibilitando aumento da faixa de pH e temperatura durante as reações de biotransformação (Gondim e Silba, 2005).

Resultados similares encontrados para o PHBV e ST-DVB foram observados por BOROS *et al.* (2013) na imobilização da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em suportes de sílica gel ativados com GA. A presença do GA ocasionou mudança conformacional da enzima pela movimentação da tampa protetora do sítio ativo, o que consequentemente diminuiu a atividade hidrolítica. Esse comportamento também foi constatado por ERDEMIR *et al.* (2009) na imobilização da lipase de *Candida rugosa* com cálix[n]arene.

4.3.4. Efeito da combinação entre os aditivos no processo de imobilização da LBc

A Tabela 6 representa o tipo de interação e a concentração dos aditivos na imobilização da LBc nos suportes poliméricos. Inicialmente foram avaliadas as interações utilizando as concentrações apresentadas nas seções supracitados, PEG a

5%, TX a 10% e GA a 2,5%, respectivamente. Na sequência, a concentração de cada aditivo foi fracionada em 50% (PEG a 2,5%, TX a 0,5% e GA a 1,25%) e assim avaliada a interação entre os mesmos, analisando se a mudança na concentração afetaria o desempenho do derivado.

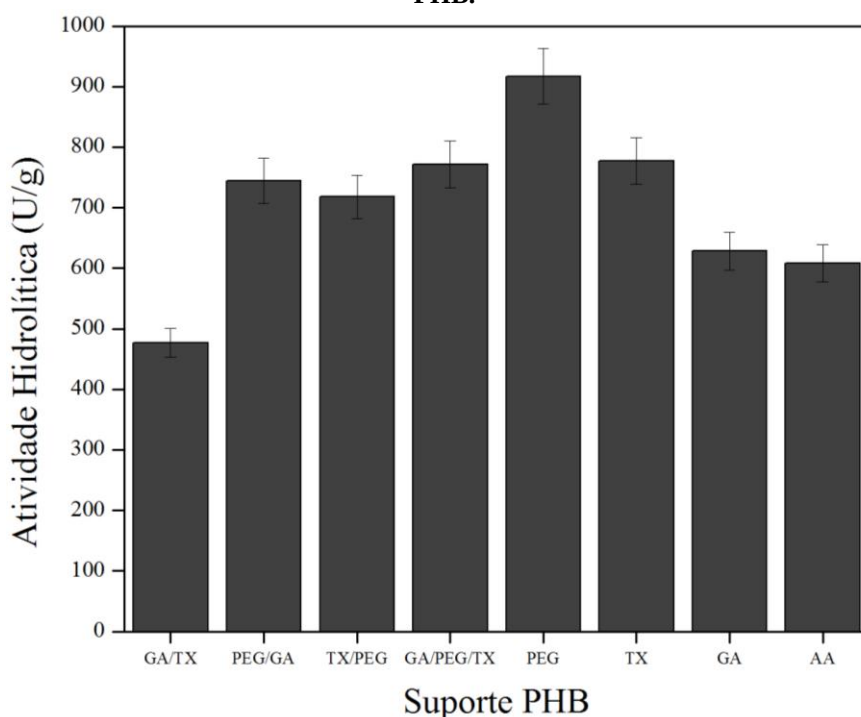
Tabela 6: Concentrações e combinações dos aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc nos suportes poliméricos. * – ausência de aditivos.

Aditivo (%)	GA TX	PEG A	TX PEG	GA PEG TX	GA TX	PEG A	TX PEG	GA PEG TX	AA*
GA (v/v)	2,5	2,5	0	2,5	1,25	1,25	0	1,25	0
PEG (m/v)	0	5	5	5	0	2,5	2,5	2,5	0
TX (v/v)	10	0	10	10	0,5	0	0,5	0,5	0

Fonte: Autoria própria.

A Figura 22 apresenta os resultados de atividade hidrolítica para o derivado de PHB-LBc sob a influência da interação dos aditivos em diversas condições. Os resultados apresentaram aumento satisfatório da atividade hidrolítica do derivado, quando comparado ao derivado na ausência de aditivos (AA), nas condições de PEG/GA, TX/PEG, GA/PEG/TX, com exceção para os derivados GA/TX.

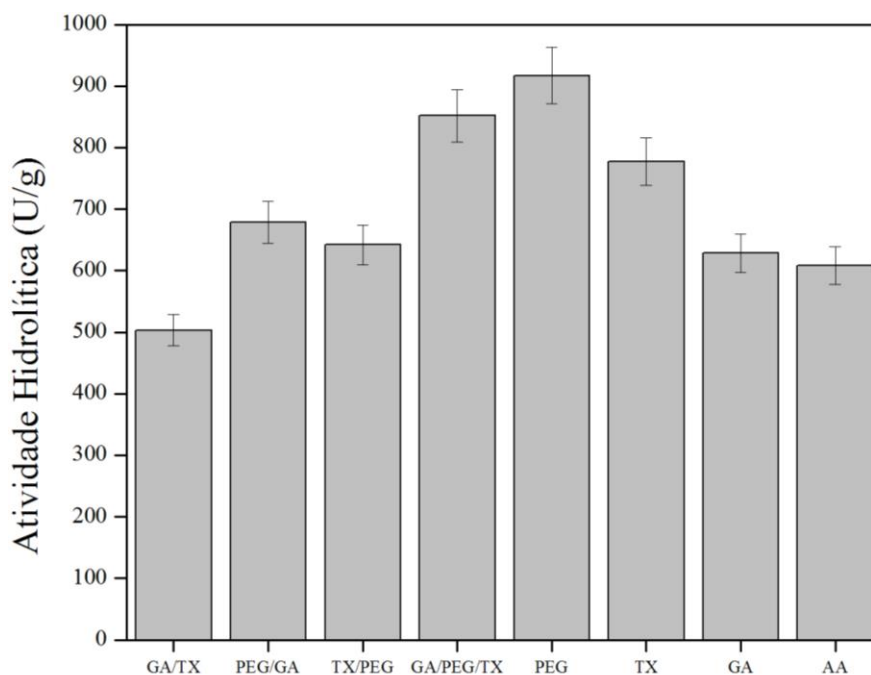
Figura 22: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc em PHB.



Fonte: Autoria própria.

Quando a concentração dos aditivos combinados foi fracionado em 50%, os resultados presentes na Figura 23 para PEG/GA e TX/PEG diminuíram em aproximadamente 10% e o GA/PEG/TX apresentou aumento de aproximadamente 10%, com relação as concentrações iniciais. Os resultados da interação GA/TX em qualquer concentração foi menor que o da lipase adsorvida sem aditivos. Porém, podemos observar que os melhores resultados para o derivado de PHB-LBc foi obtido quando o PEG foi utilizado individualmente.

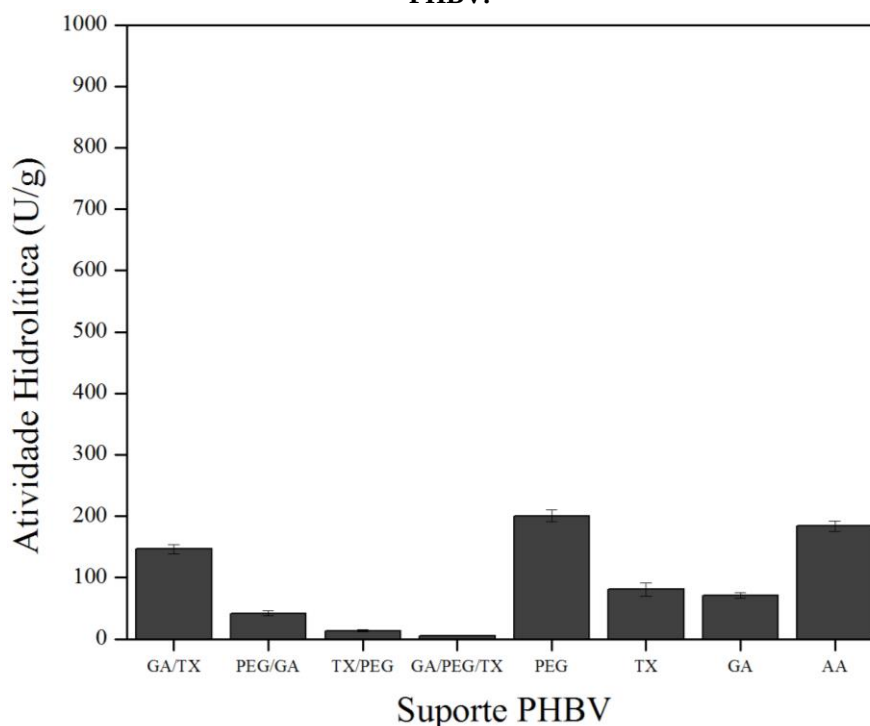
Figura 23: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc em PHB. Com as concentrações das combinações entre os aditivos reduzidas em 50%.



Fonte: Autoria própria.

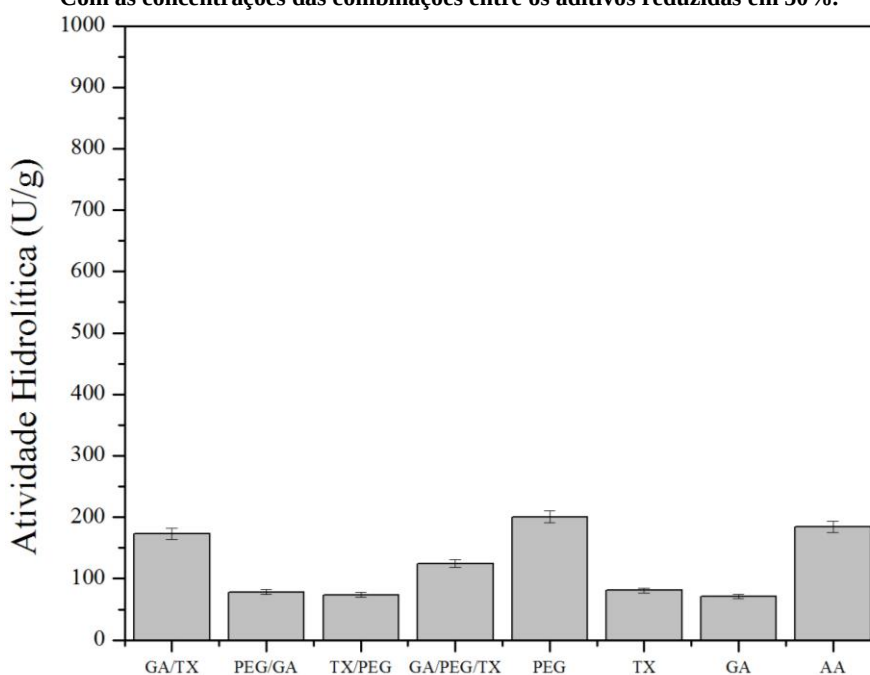
A interação entre os aditivos em todas as condições estudadas, assim como cada um individualmente, não proporcionaram resultados significativos de atividade hidrolítica da lipase imobilizada em PHBV, como mostra a Figura 24. Porém, é possível observar na Figura 25 que o fracionamento dos aditivos proporcionaram melhores resultados quando comparados aos derivados nas concentrações iniciais, porém o melhor resultado apresentado pelo derivado foi na presença de PEG a 5% e os resultados das interações foram menores que o imobilizado na ausência de aditivos (AA).

Figura 24: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc em PHBV.



Fonte: Autoria própria.

Figura 25: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc em PHBV. Com as concentrações das combinações entre os aditivos reduzidas em 50%.

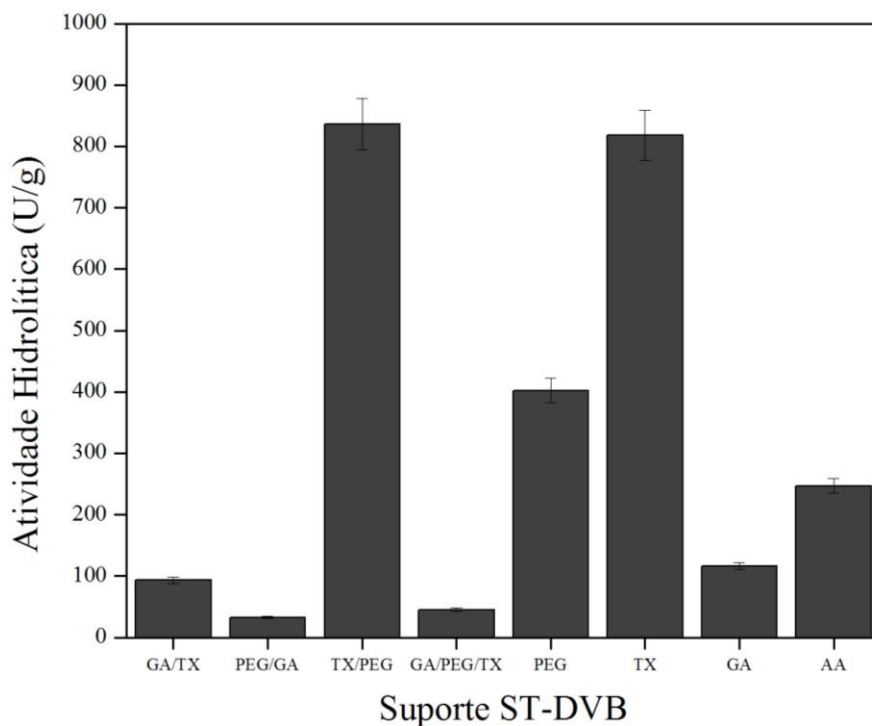


Fonte: Autoria própria.

O derivado de ST-DVB-LBc mostrou aumento expressivo na atividade hidrolítica quando comparado ao derivado sem o uso de aditivos com 247 ± 12 U/g, utilizado TX/PEG aumentou para 836 ± 41 U/g com a concentração inicial presente na Figura 26 e de 901 ± 45 U/g com a concentração fracionada em 50% como mostra a

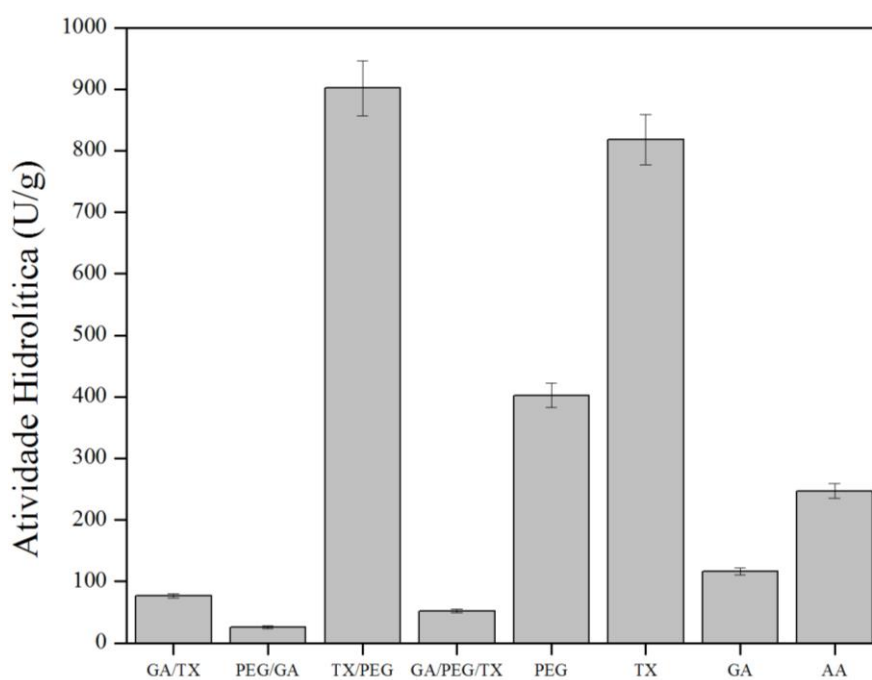
Figura 27. As outras interações dos aditivos em qualquer concentração foram insatisfatórias comparadas a atividade hidrolítica da lipase sem o uso de aditivos.

Figura 26: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc em ST-DVB.



Fonte: Autoria própria.

Figura 27: Atividade hidrolítica (U/g) para os aditivos GA, PEG e TX na imobilização da LBc em ST-DVB. Com as concentrações das combinações entre os aditivos reduzidas em 50%.



Fonte: Autoria própria.

Fica evidente que a combinação entre os aditivos possibilita mudanças no comportamento de cada derivado. Também foi observado que a mudança da concentração influencia na atividade hidrolítica. Podemos observar que a interação com outros aditivos proporcionou melhorias ao derivado de PHB-LBc, com relação ao uso de GA, que isoladamente apresentou resultados insatisfatórios. A diminuição da concentração dos aditivos GA/PEG/TX proporcionou melhor resultado para o PHB-LBc. Já para os outros suportes a presença do aditivo foi negativa em qualquer condição. BETANCOR *et al.* (2006) constataram que a variação da concentração do GA diminuiu a quantidade de moléculas do aditivo no suporte, além disso de acordo com BARBOSA *et al.* (2012a), os dímeros de GA proporcionam certo grau de hidrofobicidade à superfície do suporte.

Portanto, mesmo com o auxílio dos outros aditivos, nos suportes possivelmente mais hidrofóbicos (PHBV e ST-DVB) que o PHB, o GA pode ter conferido maior grau de hidrofobicidade, como discutido anteriormente na seção 4.3.3, isso pode prejudicar a imobilização e pode explicar os baixos valores em atividade hidrolítica quando a lipase foi imobilizada a esses suportes, pois como o dispersante utilizado foi água, quando mais hidrofóbico o suporte menor será interação com o meio, dificultando a difusão da solução enzimática nestes suportes.

Para o PHB, o GA pode ter formado braços espaçadores ligando a lipase e o suporte, além disso, a menor concentração do aditivo pode ter proporcionado interações hidrofóbicas com a superfície do derivado, além das ligações covalentes, que possibilitou a melhor eficiência na imobilização da lipase. Os outros aditivos (PEG e TX) podem ter influenciado na rigidez da estrutura da lipase, impedindo que a tampa protetora cobrisse o sítio ativo e evitando ligações com grupos aminos do sítio ativo da lipase na presença do GA (Betancor *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2012A).

Quando analisado o desempenho dos aditivos de TX e PEG na imobilização da LBc, pode ser observado que a presença de ambos proporcionou aumento na atividade do derivado de PHB-LBc e aumento expressivo no derivado de ST-DVB-LBc de ~70 % utilizando a concentração inicial e de ~73 % para a concentração fracionada. A presença do PEG na solução aquosa de lipase pode auxiliar molhabilidade da superfície do suporte, combinada a influência do TX que mantém a lipase com sítio ativo expostos pode ter levado ao aumento da carga adsorvida de lipase no suporte.

O aumento no desempenho do imobilizado em ST-DVB quando fracionada a concentração, assim como o baixo desempenho no suporte de PHBV podem estar relacionados diretamente a quantidade de cada aditivo presente nas soluções. Pois o excesso de aditivos pode influenciar negativamente nos resultados, assim como a falta do mesmo pode não ser eficiente para maior desempenho. Portanto a concentração utilizada pode não ter sido o bastante para influenciar em bons resultados para o PHBV-LBc, do mesmo modo no qual a mudança da concentração mostrou melhoras significativas para o ST-DVB-LBc, além disso, essas propriedades podem variar de acordo com o tipo de suporte ou lipase (Soares *et al.*, 2002; Betancor *et al.*, 2006; De Oliveira *et al.*, 2018). Nesse sentido, pode-se analisar que a melhor atividade hidrolítica foi utilizando 1,25% GA, 2,5% PEG e 0,5% Triton X-100 para o PHB (851 ± 42 U/g) e 2,5 PEG e 0,5 TX para o ST-DVB com (901 ± 45 U/g). Entretanto a atividade foi ~7% menor quando comparada com o derivado na presença de 5% PEG de (917 ± 40 U/g), conforme Seção 4.3.1. Já o suporte de PHBV apresentou melhores resultados na ausência dos aditivos.

4.3.5. Rendimento do imobilizado

Os rendimentos dos derivados-LBc apresentados na Tabela 7, foram obtidos com base no resultado da atividade hidrolítica da lipase livre 1020 ± 12 U/g. Os resultados de rendimento do imobilizado estão apresentados na Tabela 7. Podemos observar no ensaio 12, os resultados do rendimento dos derivados na ausência de aditivos. O derivado de PHB-LBc apresentou rendimento de imobilização de 60%, seguido pelo ST-DBV-LBc e PHBV-LBc com respectivos 24% e 18%.

Tabela 7: Rendimento do imobilizado de PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc

Ensaio	GA (v/v)	PEG (m/v)	TX (v/v)	Rend. PHB (%)	Rend. PHBV (%)	Rend. ST-DVB (%)
1	0	5	0	90	20	39
2	0	0	1	76	8	80
3	2,5	0	0	62	7	11
4	2,5	0	1	47	14	9
5	1,25	0	0,5	49	17	8
6	2,5	5	0	73	4	3
7	1,25	2,5	0	67	8	3
8	0	5	1	70	1	82
9	0	2,5	0,5	63	7	88
10	2,5	5	1	76	1	4
11	1,25	2,5	0,5	83	12	5
12	0	0	0	60	18	24

Fonte: Autoria própria.

Após a adição dos aditivos, o PHB-LBc apresentou aumento considerável no rendimento do imobilizado, quando comparado ao derivado na ausência de aditivos, como mostrado na Tabela 6 para os ensaios 1, 2, 6, 8, 10 e 11. Com destaque para a presença do aditivo PEG individualmente apresentando aumento de ~34% com relação ao derivado sem aditivos. O suporte de ST-DVB mostrou aumento significativo na presença dos aditivos TX e PEG, como mostram os ensaios 2, 8 e 9, com expressivo aumento na presença dos aditivos TX e PEG simultaneamente com aumento do rendimento da imobilização de ~73%. Para o derivado de PHBV, a adição dos aditivos não mostrou mudanças significativas em rendimento.

Resultados semelhantes ao desse trabalho foi encontrado quando o aditivo PEG foi adicionado ao protocolo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* por encapsulação sol-gel, o derivado passou de 43% em rendimento da imobilização para 91,4% (Souza *et al.*, 2014). Quando avaliado a concentração do TX na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas na presença de PEG, quando a concentração inicial passou de 1 mM para 0,5 mM, houve aumento de 30% de rendimento da imobilização, a medida que a concentração de TX diminuía o rendimento do imobilizado aumentava, chegando a 98% em 0,1 mM (Yang; Zhang, 2019).

Portanto os aditivos podem auxiliar no desempenho da técnica da imobilização proporcionando maior retenção de lipase ao suporte e ajudar a manter o sítio ativo da lipase exposto. Na sequência serão demonstradas a caracterização estrutural dos polímeros e derivados certificando a eficiência da imobilização.

4.4.Caracterização estrutural do polímero e do derivado imobilizado

4.4.1. Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Dentro da região de estudo, 600 a 4000 cm^{-1} , diferenças na intensidade de absorção, deslocamento e/ou sobreposição de alguns picos foram observados. É esperado a identificação dos grupos funcionais contidos na lipase de *Burkholderia cepacia* livre, grupos que formam os suportes poliméricos PHB, PHBV e ST-DVB e grupos funcionais dos aditivos PEG, TX e GA. A identificação dos componentes químicos foi auxiliada a partir dos dados presentes na Tabela 8, de acordo com os possíveis movimentos de cada molécula e a região esperada no espectro de FTIR.

Tabela 8: Tabela de identificação do comprimento de onda dos grupos funcionais para análise espectral.

Identificação	Grupo	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Referência
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (LBc)	Amida A	~3300;	Cantor; Achimmel, 1980; Kawano; Laure; Giglio, 1982; Andrade <i>et al.</i> , 2010
	Amida I	~1650;	
	Amida II	~2900; ~1560;	
	Amida III	1300 - 1000	
Polihidroxi-butirato (PHB) Polihidroxi-butirato do co-hidroxi-valerato (PHBV)	C=O	1850 - 1650;	Colthup, 1950; Pandian <i>et al.</i> , 2009; Cabrera-Padilla <i>et al.</i> , 2015; Wei; Liang; McDonald, 2015
	C-CH ₃	3000 - 2800; 1450 - 1350; 1270 - 1170;	
	C-O-C	1450 - 1200; 1300 - 900;	
	O-H	3700 - 2995; 1450 - 1200;	
	C-O	1300 - 900;	
Estireno Divinilbenzeno (ST-DVB)	CH ₂	2950 - 2800; ~1450; ~740;	Colthup, 1950; Chaudhary; Alves <i>et al.</i> , 2017; Sharma, 2019
	C=C	1650 - 1590;	
	Anel Aromático	3050 - 3000; 1650 - 1570; 1540 - 1490; ~1100	
Triton X-100 (TX)	C-CH ₃	3000 - 2800; 1450 - 1350; 1270 - 1170;	Colthup, 1950; Mateo <i>et al.</i> , 2007; Kong <i>et al.</i> , 2010
	CH ₂ -O-CH ₂	3000 - 2880; ~1450, ~1320; 980 - 900;	
	Anel Aromático	3050 - 3000; 1650 - 1570; 1540 - 1490; ~1100;	
		O-H	
Polietilenoglicol (PEG)		3700 - 2995; 1450 - 1200	Colthup, 1950; Mansur; Oréfice; Mansur, 2004; Yang <i>et al.</i> , 2012; Yunos <i>et al.</i> , 2014
	C-O-C	3750 - 3000; 1450 - 1200; 1300 - 900;	
	CH ₂	1050 - 1180; 500 - 625;	
	O-H	2700 - 2950; 1450	
Glutaraldeído (GA)	C=O	1850 - 1650;	Colthup, 1950; Gunda <i>et al.</i> , 2014
	CH ₂ -CH ₂	2950 - 2800; ~1450; ~740;	
	C-H	3300 - 2700; 1470 - 1300	

Fonte: Autoria Própria

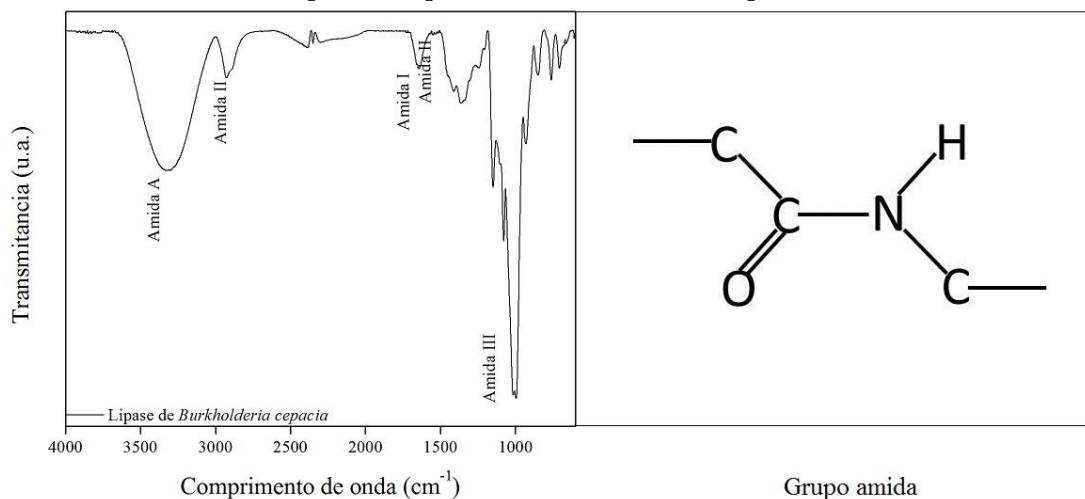
Na sequência serão detalhas as regiões nos espectrogramas dos derivados na ausência e na presença dos aditivos

4.4.1.1. FTIR-ATR para os derivados na ausência de aditivos

De acordo com o espectro da lipase de *Burkholderia cepacia* (Figura 28), as bandas características para as amidas A e I, foram detectadas através dos comprimentos de onda em 3321 cm⁻¹ e 1642 cm⁻¹, respectivamente, característico das

vibrações de bandas N-H (Pavia *et al.*, 2010). As amidas II e III aparecem em torno do comprimento de onda de 2800 e 1535 cm^{-1} e de 1000 a 1100 cm^{-1} estão associados às ligações C-C e C-N respectivamente (Andrade *et al.*, 2010). Ambos os picos são representativos da cadeia proteica da lipase (Colthup, 1950; Forato *et al.*, 1998).

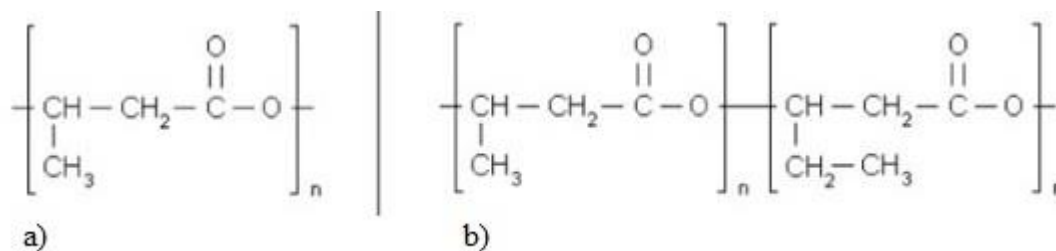
Figura 28: Espectro da Lipase de *Burkholderia cepacia* e grupo amida característico das cadeias proteicas que formam a estrutura da lipase.



Fonte: Autoria própria.

Os suportes puros, antes da imobilização, de PHB e PHBV são similares nos componentes que formam sua estrutura química como mostra a Figura 29, diferenciando apenas no tamanho das cadeias e a presença de uma molécula a mais de CH_2 no copolímero. De acordo com o espectro de FTIR do polímero e seu copolímero nas Figuras 30 e 31 apresentam a 1726 cm^{-1} banda com estiramento da ligação dos ésteres alifáticos ($\text{C}=\text{O}$) com forte absorção, assim como uma série de bandas intensas entre 1000 e 1350 cm^{-1} representativas da vibração do alongamento assimétrico do grupo C-O-C, que compõem os monômeros do éster (Pandian *et al.*, 2009; Wei; Liang; Mcdonald, 2015; Cabrera-Padilha *et al.*, 2015)

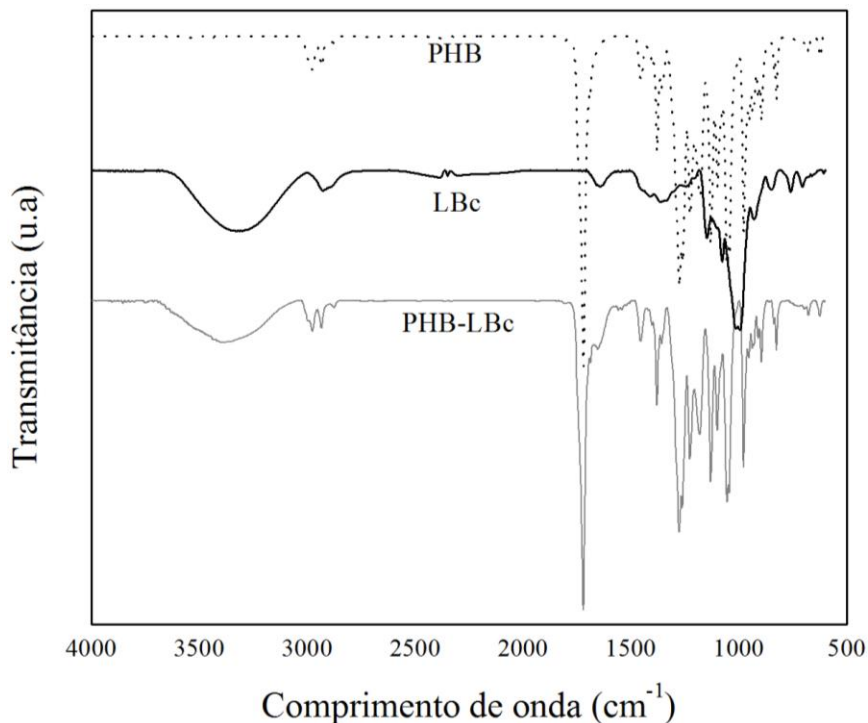
Figura 29: Estrutura química dos suportes de a) PHB e b) PHBV.



Fonte: Machado *et al.*, 2010.

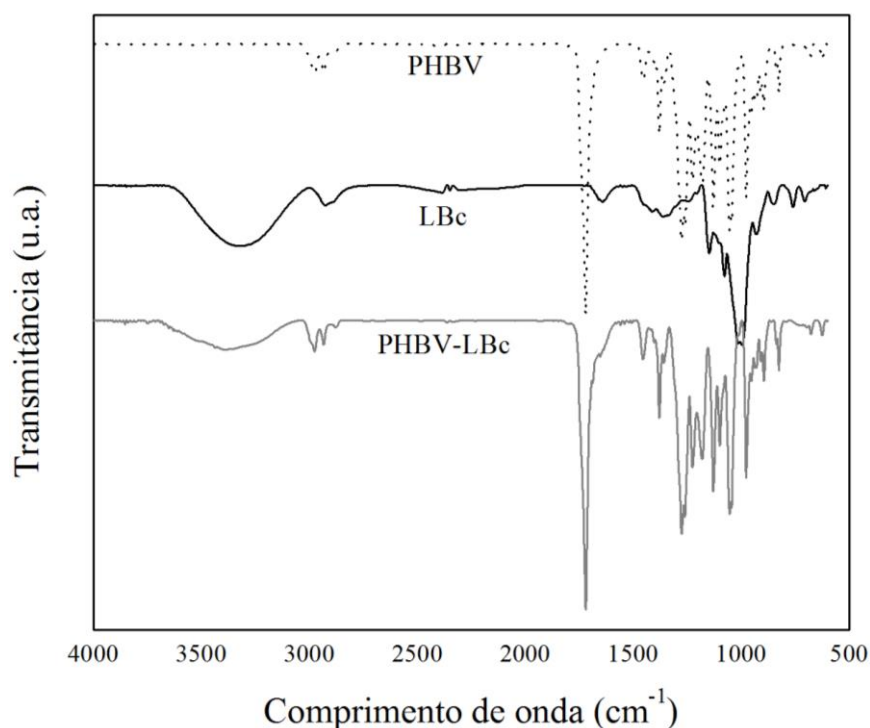
Banda com intensidade menor do que as anteriores é observada a 1456 cm^{-1} , devido a formação assimétrica do CH₃. Outras bandas na faixa de 1000 a 1500 cm^{-1} são causadas por vibrações ou estiramento das ligações CH₂. Praticamente não são observadas variações significativas entre os grupos funcionais presentes no PHB e PHBV. De acordo com Pandian *et al.* (2009), o pico referente a região de $\sim 1728\text{ cm}^{-1}$ confirma a presença dos polihidroxialcanoatos (PHAs), que originam os polímeros PHB ou PHBV.

Figura 30: Espectro de FTIR-ATR, do suporte PHB, lipase livre e derivado PHB-LBc.



Fonte: Autoria própria.

Figura 31: Espectro de FTIR-ATR, do suporte PHBV, lipase livre e derivado PHBV-LBc.



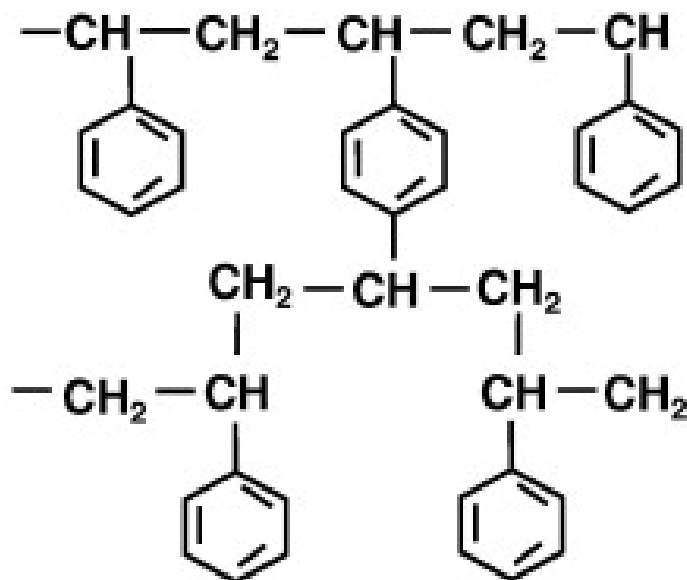
Fonte: Autoria própria.

Quando a LBc foi imobilizada em PHB (Figura 30) e PHBV (Figura 31), existe uma sobreposição no pico vibracional da lipase nos suportes nas bandas característica das amidas II e amida III em torno de $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ e 1150 cm^{-1} , respectivamente. Podemos observar no espectrograma do derivado de PHB-LBc a presença da banda de característica da amida A na região de ~ 3300 e da amida I na região de ~ 1650 que mostraram mudanças em relação ao suporte livre. Tanto para o PHB e PHBV puros, não apresentam adsorção espectral nesta região, muito provavelmente pela ausência dos picos representativos da lipase. Haja vista que na lipase imobilizada, a intensidade de estiramento das ligações C-O e N-H foram detectadas. As mudanças que ocorrem nos comprimentos de onda supracitados parece refletir na imobilização da lipase.

A Figura 32 representa a estrutura química do ST-DVB, podemos observar a presença de anéis aromáticos e grupos alcanos (C-CH₂). O espectro de FTIR da Figura 33 para suporte antes da imobilização, apresenta bandas características de anel aromático nas regiões de 3100 a 2900 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 1490 cm^{-1} (Jang; Kim, 2000; Chaudhary; Sharma, 2019). As bandas de $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$, ~ 1440 e 690 são regiões com picos característicos do modo vibracional das moléculas de CH₂. Observa-se a ~ 3300

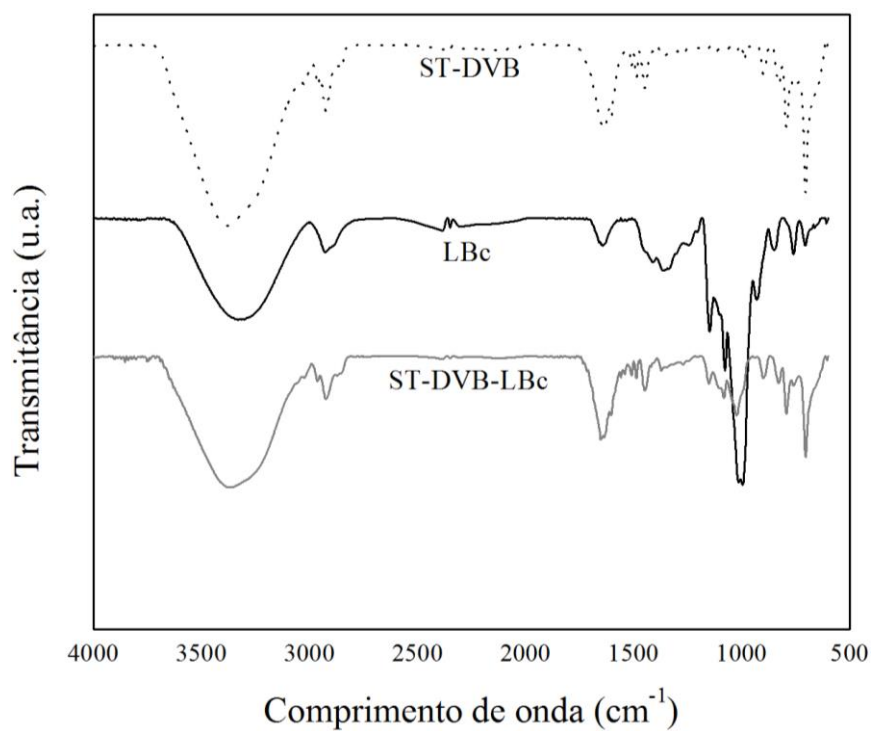
cm^{-1} , pico intenso proveniente da presença de água do estiramento dos grupos O-H (Alves *et al.*, 2017, Colthup, 1950)

Figura 32: Estrutura química do polímero de ST-DVB.



Fonte: Adaptado de Koseoglu-Imer; Keskinler, 2013.

Figura 33: Espectro de FTIR-ATR, do suporte ST-DVB, lipase livre e derivado ST-DVB-LBc.



Fonte: Autoria própria.

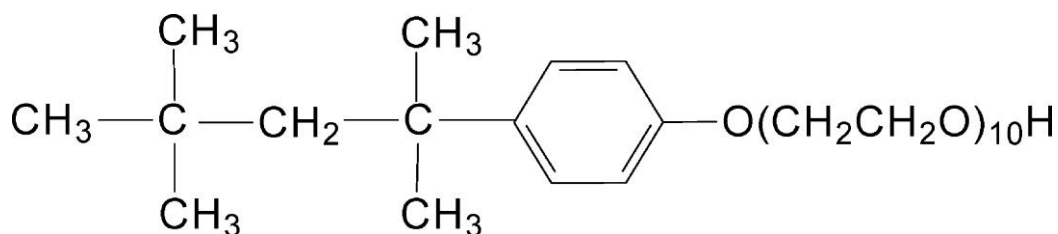
Após a imobilização na região da amida III ($\sim 1150\text{ cm}^{-1}$), o espectro mostra presença de bandas que não são observadas para o suporte puro. Como bandas característica de anel aromático e grupo CH_2 do ST-DVB são de maior intensidade, isso pode ter havido a sobreposição das amidas A, I e II localizadas na mesma região. As mudanças apresentadas pelos espectrogramas dos derivados PHB-LBc, PHBV-LBc e ST-DVB-LBc antes e após a imobilização, possivelmente seja devido a presença da lipase nos suportes, confirmando a eficiência da imobilização.

4.4.1.2. FTIR-ATR dos derivados na presença de aditivos

4.4.1.2.1 Triton X-100

Para auxiliar na identificação dos grupos que formam a estrutura do TX, foi utilizada como parâmetro a Tabela 7 de correlações. A Figura 34 representa a estrutura do tensoativo que é formado por duas extremidades de polaridades diferentes. A extremidade a esquerda é composta inicialmente pelo grupo terc butil, seguido do grupo isopropil e anel aromático, representando a extremidade apolar. Já sua calda é formada pelo conjunto de éter alifático $((\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_{10}\text{H})$ e terminada em hidroxila (OH) formando a extremidade polar (Liu; Guo, 2008).

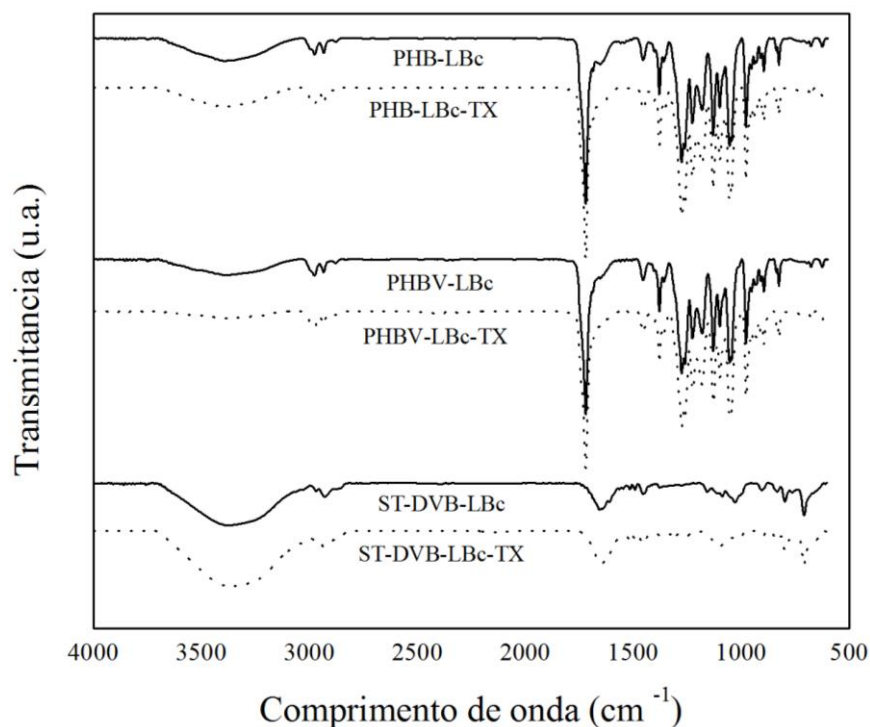
Figura 34: Representação da estrutura do tensoativo Triton X-100.



Fonte: Liu; Guo, 2008.

De acordo com a Figura 35, os derivados de PHB-LBc e PHBV-LBc, não apresentaram diferenças em seus espectros na presença (linha pontilhada) ou ausência (linha sólida) do TX na imobilização. Esse resultado pode estar relacionado a similaridade dos monômeros que formam a estrutura dos polímeros e do tensoativo, de modo que as regiões vibracionais no espectro são as mesmas para ambos, portanto pode ter ocorrido a sobreposição dos picos característicos do aditivo.

Figura 35: Espectrograma dos derivados de PHB, PHBV e ST-DVB na presença e ausência de Triton X-100.



Fonte: Autoria própria.

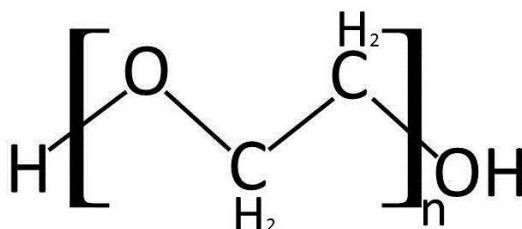
Porém quando analisamos o espectrograma do ST-DVB-LBc na Figura 35, notamos mudanças nas bandas de transmitância, possivelmente devido a presença do TX no derivado. Os picos nas regiões no espectro de 1100 cm⁻¹ e 1295 cm⁻¹ estão associados ao grupo oxido (C-O-C), o aumento na intensidade do sinal em 3372 cm⁻¹ devido a absorção do OH, já os picos em 1247 cm⁻¹ e 1348 cm⁻¹ corresponde a região de absorção do grupo terc-butil, o aumento na intensidade em 1646 cm⁻¹ e o pico em ~1100 cm⁻¹ pode indicar a presença de benzeno característico da estrutura do TX (Kong *et al.*, 2010; Colthup, 1950).

De acordo com GHORABI *et al.* (2012) o anel benzeno da estrutura do tensoativo tem forte interação com os anéis benzênicos da estrutura da superfície dos nanotubos de carbono devido as suas semelhanças. As mudanças ocorridas no espectrograma do derivado de ST-DVB-LBc-TX podem ser atribuídas aos resíduos de TX que não são totalmente eliminados durante o processo de lavagem (Mateo *et al.*, 2007).

4.4.1.2.2. Polietilenoglicol

A estrutura química do PEG está esquematizada na Figura 36. Formado pela presença de grupo de hidroxila em suas extremidades e na cadeia central éter alifático.

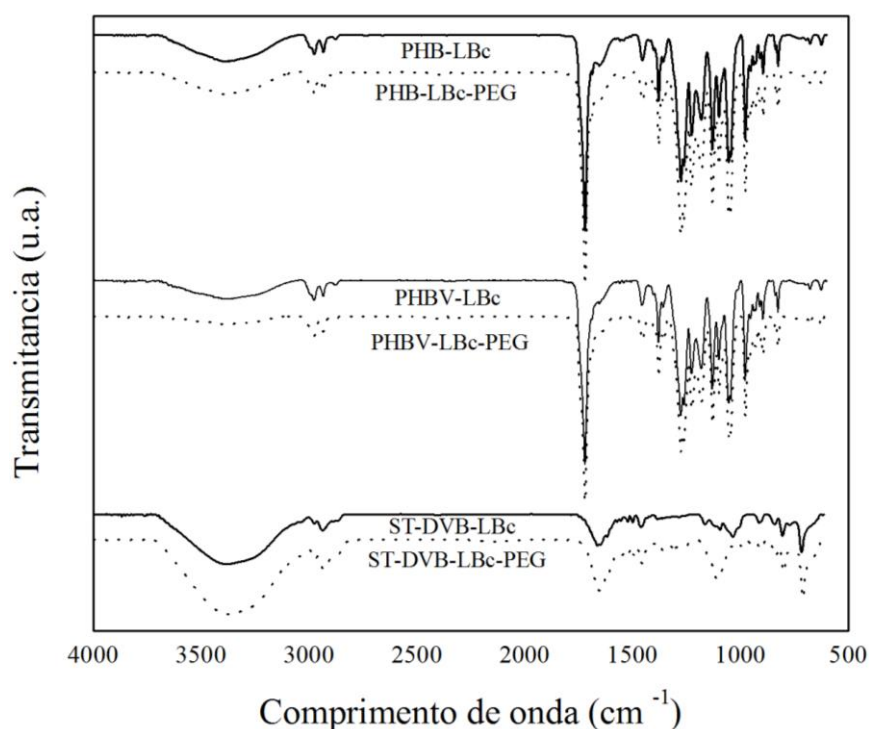
Figura 36: Estrutura química do polietilenoglicol.



Fonte: Autoria própria.

Os espectros dos derivados de PHB-LBc e PHBV-LBc Figura 37, não apresentam novas bandas na presença do aditivo, isso pode estar relacionado com a similaridade dos modos vibracionais presentes nos grupos de moléculas que os formam, fazendo com que haja sobreposições das bandas.

Figura 37: Espectrograma dos derivados de PHB-LBc (a), PHBV-LBc (b) e ST-DVB-LBc (c) na presença e ausência de PEG-1500.



Fonte: Autoria própria.

Porém podemos notar diminuição na intensidade nas bandas em 3300 cm^{-1} , que possivelmente está atrelada a presença de hidroxilas do aditivo que podem ter

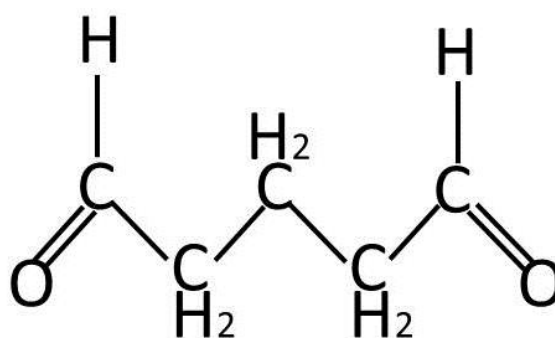
formado pontes de hidrogênio com os suportes e enzima, levando a mudança da intensidade do modo vibracional da molécula, reduzindo a intensidade da hidroxila e passando a exibir o pico da ligação N-H que antes estava sobreposto. Essa mudança é apresentada em maior intensidade no derivado de PHBV-LBc (Opera, 2010).

Quando analisado o espectrograma do derivado de ST-DVB-LBc, na presença do PEG, notamos o aparecimento de novos picos, característicos do grupo éter (C-O-C) 1098 cm^{-1} e banda intensa de absorção em 3374 cm^{-1} característico da presença de hidroxila e pico em 950 cm^{-1} do estiramento do grupo CO (Colthup, 1950; Mansur; Oréfice; Mansur, 2004; Yang *et al.*, 2012; Yunos *et al.*, 2014).

4.4.1.2.3. Glutaraldeído

As vibrações característica da molécula de GA, Figura 38, atribuíram alterações nos espectros quando comparados suportes/lipase e suporte/lipase/GA.

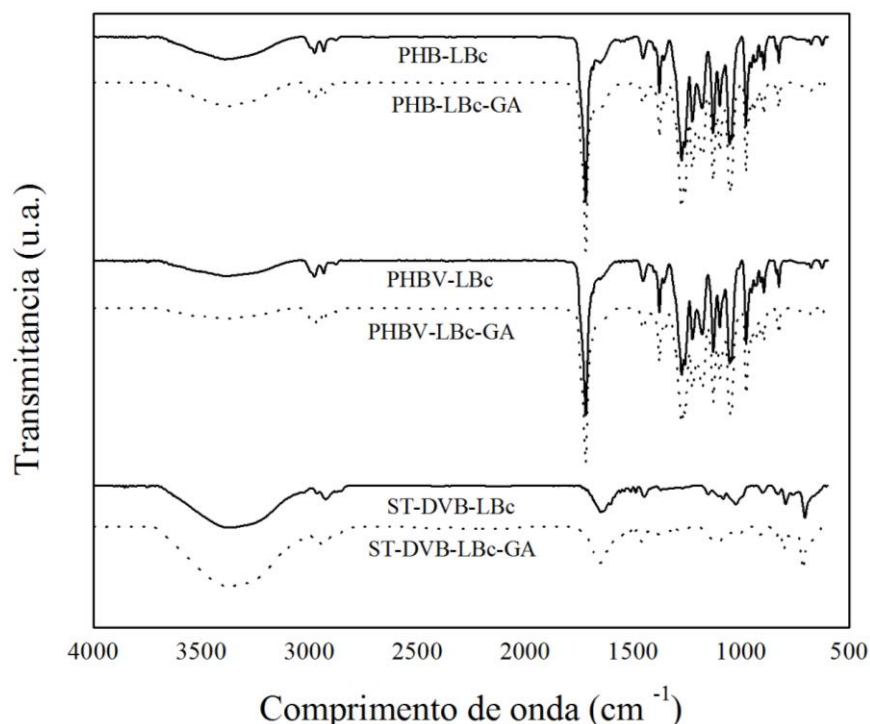
Figura 38: Estrutura química do glutaraldeído



Fonte: Adaptado de Mansur et al., 2008.

A Figura 39 mostra a presença da banda de amida II entre 1507 a 1576 cm^{-1} para o derivado PHB-LBc e não aparecem para o PHB-LBc-GA, o mesmo acontece para o derivado de PHBV-LBc. Foi observado o alongamento e sobreposição dos picos na região da amida II na presença do glutaraldeído, o alongamento de banda pode estar relacionado as modificações que o derivado pode proporcionar a amina devido as ligações covalentes. Essa região apresenta o modo vibracional da molécula de C-N-H (amina II), os grupos aldeídos podem ser responsáveis pela formação das pontes de Schiff (C=N), o que pode ter levado ao desaparecimento da banda (Muzzarelli, 2009; Forato *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011).

Figura 39: Espectrograma dos derivados de PHB, PHBV e ST-DVB na presença e ausência de Glutaraldeído.



Fonte: Autoria própria.

As mudanças acontecidas como o aumento na intensidade dos picos vibracionais da carbonila na região de 1700 a 1730 cm⁻¹ nos derivados de PHB e PHBV e a presença do pico em 1720 cm⁻¹ para o derivado de ST-DVB presentes na Figura 33, indicam a possibilidade de ter ocorrido reações dos derivados ou da lipase com o GA (Can; Ozmen; Ersoz, 2009; Beppu *et al.* 2007). O aumento expressivo da intensidade do pico em 3365,03 cm⁻¹ para o ST-DVB-LBc-GA, pode estar relacionadas aos novos radicais OH formados no derivado devido a presença do GA. Em contrapartida a diminuição na intensidade do pico de 3450 cm⁻¹ para PHBV-LBc-GA pode ter relação com a formação da reação de Schiff e pontes de hidrogênio devido a presença do GA, que pode ter ocasionado na diminuição do sinal de OH e evidenciando o pico de C-N, antes sobreposto (Schiffman; Schauer, 2007).

Os espectros da lipase imobilizada usando aditivos mostrou semelhança no comportamento dos picos nas mesmas regiões que contém o grupamento amida. Modificações espectrais nestas regiões podem significar que a técnica de imobilização da lipase por adsorção física foi eficiente e corroboram com a existência de diferentes ligações químicas da enzima ao ser adsorvida aos suportes poliméricos. Essas observações também foram condizentes com os trabalhos anteriores usando a lipase

de mesma fonte, porém, imobilizada em outros suportes (Andrade *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2018).

Os Anexos A mostram os espectros separados para a lipase livre e imobilizada na presença e ausência de aditivos, assim como os espectrogramas para os suportes puros para melhor compreensão dos resultados apresentados.

4.4.2. Análises Térmicas

Foram realizadas técnicas termoanalíticas, TGA e DSC, para avaliar as mudanças físicas, químicas e subprodutos formados no aquecimento para a LBc, suportes de PHB, PHBV e ST-DV, antes e após a imobilização. As análises termoanalíticas ajudaram a entender a estabilidade térmica oferecida a lipase pelos suportes.

4.4.2.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise foi utilizada para determinar a variação da massa da lipase livre, dos suportes poliméricos antes e após a imobilização. A partir dos termogramas apresentados, foi possível caracterizar as amostras quanto suas decomposições térmicas. As regiões de limite de perda de massa presentes na Tabela 9, foram definidas a partir das variações apresentadas pela DTG de cada termograma, que serão discutidos na sequência.

Tabela 9: Tabela de perda de massa para LBc e para os suportes poliméricos, antes e após a imobilização.

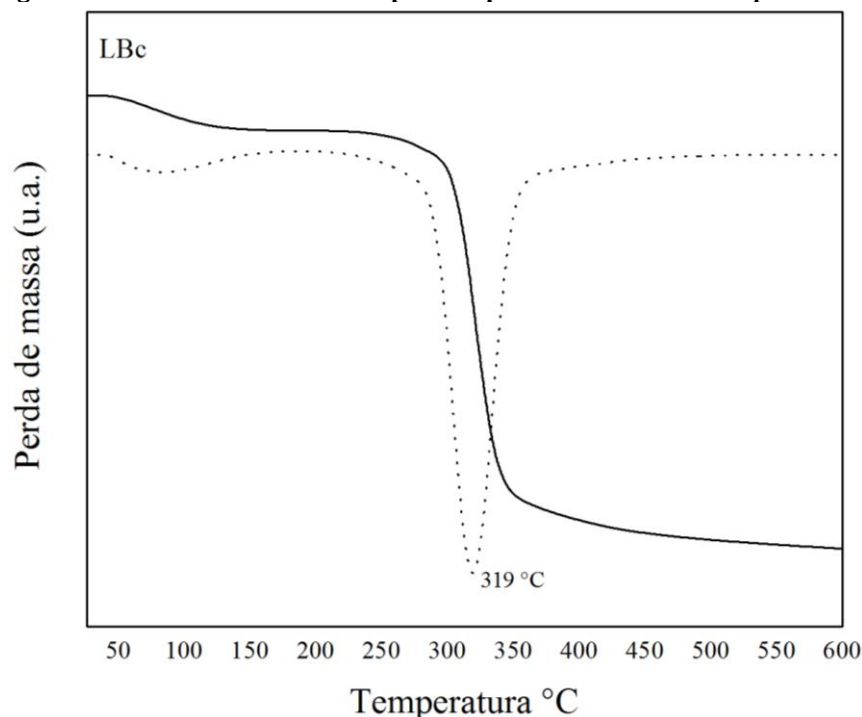
	Região I		Região II		Região III		
Amostras	T (°C)	Perda de massa (%)	T (°C)	Perda de massa (%)	T (°C)	Perda de massa (%)	Perda de massa Total (%)
LBc	25-200	6,81	200-600	82,42	-	-	89,23
PHB	25-250	0,38	250-600	98,11	-	-	98,49
PHB-LBc	25-175	0,82	175-600	96,40	-	-	97,22
PHBV	25-250	0,29	250-600	98,41	-	-	98,70
PHBV-LBc	25-250	0,68	250-600	97,86	-	-	98,54
ST-DVB	25-370	0,49	370-600	88,65	-	-	89,2
ST-DVB-LBc	25-175	1,83	175-380	16,76	380-600	69,26	87,85

Fonte: Autoria própria.

O termograma da LBc em sua forma livre (Figura 40) apresentou perda de massa de 6,81 % na região I de 25 à 200 °C, atribuída perda de água presente em sua superfície ou fixadas fortemente entre os poros. De acordo com TURNER e VULFSON (2000) a perda de massa de até 10% está relacionada à água ligada na superfície da estrutura da lipase, comum entre diversas proteínas. Os autores comprovaram que os resultados da perda de massa está relacionada a evaporação da água, através da comparação com os resultados da quantidade de água das proteínas analisados por Karl-Fisher.

Em um segundo estágio de degradação da lipase livre, entre 200 e 600 °C, houve perda de massa substancial de 82,42%. A essa temperatura pode ocorrer a perda de água intimamente ligadas a proteína da LBc, levando a desnaturação e degradação dos grupos proteicos (Badgujar; Bhanage, 2015). Este comportamento é comum entre as lipases e também foi encontrado por LEE *et al.* (2009) para lipase de pâncreas suíno imobilizada em nanosuportes hidrofóbicos de magnetita. Comportamento semelhante foi demonstrado por MACARIO *et al.* (2013), através do termograma da lipase de *Rhizomucor miehei*, apresentando perda de massa na região de 250 a 310 °C que foi atribuída a degradação dos componentes orgânicos da lipase (C, N, O, etc).

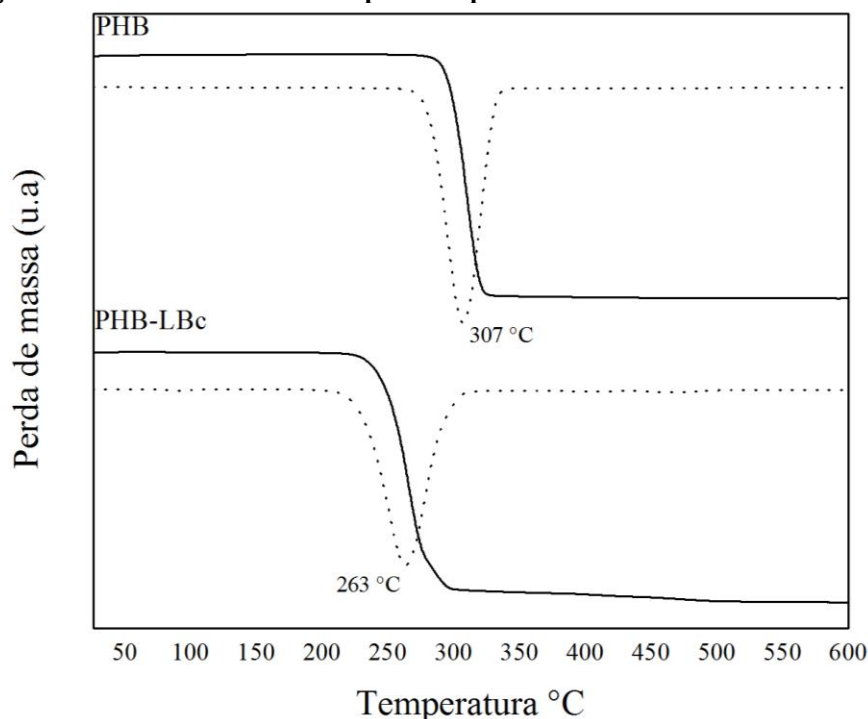
Figura 40: Curvas da TGA e DTG para a lipase de *Burkholderia cepacia* livre.



Fonte: Autoria própria.

As curvas térmicas dos suportes poliméricos PHB e PHBV antes da imobilização apresentaram perda de massa na região I de 25 a 250 °C e na região II de 250 a 600 °C, o ST-DVB apresentou perda de massa em regiões diferentes sendo para região I de 25 a 370 °C e região II de 370 a 600 °C, conforme mostram as Figuras 41, 42 e 43 respectivamente. Após a imobilização da LBc para o PHB foram observadas 2 regiões de perda de massa (Figura 41): região I (25 a 175 °C) e região II (175 a 600 °C), o derivado de PHBV (Figura 42) não apresentou mudanças nas regiões de perda de massa em seu termograma e para o derivado de ST-DVB (Figura 43) foram divididas em 3 regiões de perda de massa: região I (25 a 175 °C), região II (175 a 380 °C) e região III (380 a 600 °C).

Figura 41: Curvas da TGA e DTG para o suporte de PHB e seu derivado PHB-LBc.



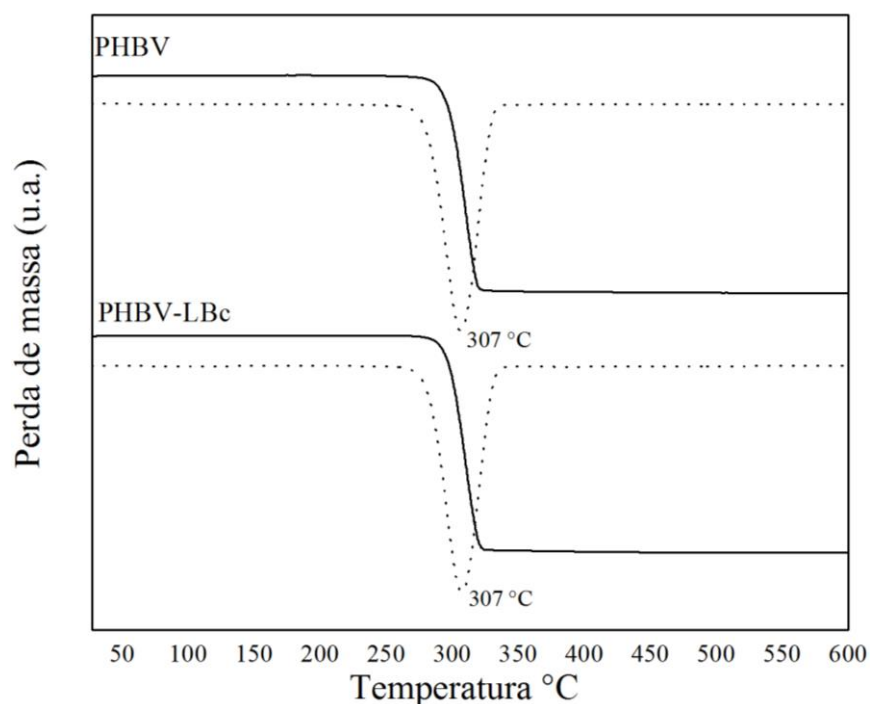
Fonte: Autoria própria.

Na região I foi identificado o primeiro estágio da perda de massa do PHB e seu derivado PHB-LBc, pode estar relacionada à evaporação da água fisicamente adsorvida na superfície da lipase, com perda de massa de 0,38% e 0,82%, respectivamente. Na região II há deslocamento na curva da DTG do derivado PHB-LBc com relação ao suporte puro e a lipase livre, representado pela TG com significativa perda de massa de 96,40% (Figura 41) a 263 °C. A partir da TG podemos identificar a presença da lipase no suporte, porém o suporte PHB diminuiu a resistência térmica da lipase, esse comportamento possivelmente ocorreu devido às

interações entre a lipase e o suporte formando novos compostos orgânicos com menor temperatura de degradação.

O termograma apresentado para o derivado de PHBV não demonstrou variações expressivas entre o suporte puro e o suporte contendo lipase. Esse comportamento pode estar relacionado à baixa carga de lipase adsorvida pela superfície do suporte, que explica sua baixa atividade hidrolítica apresentada nas seções 4.2 e 4.3.

Figura 42: Curvas da TGA e DTG para o suporte de PHBV e seu derivado PHBV-LBc.



Fonte: Autoria própria.

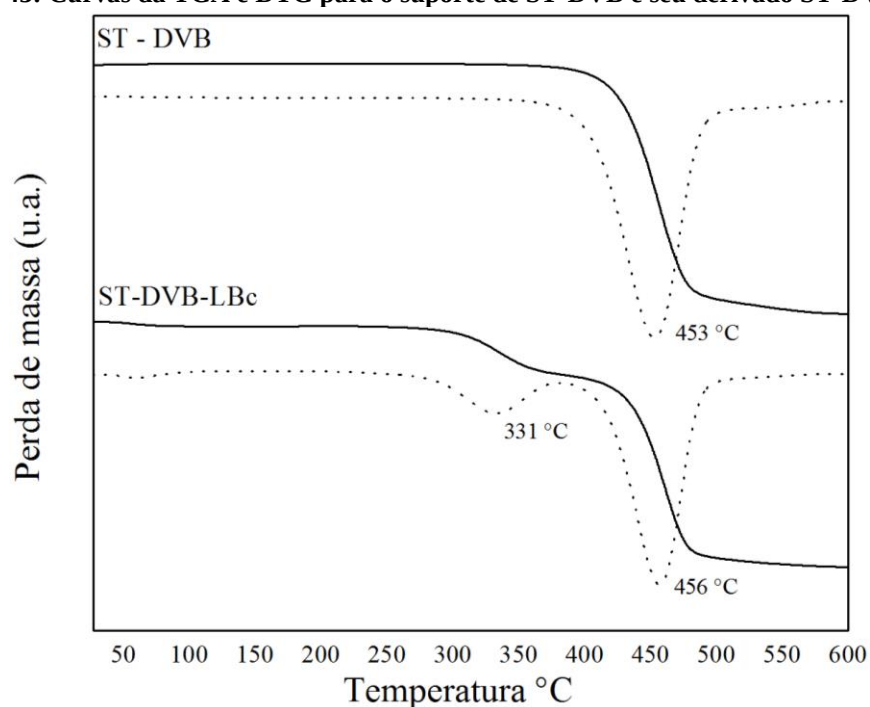
O PHB apresentou na região II uma única etapa de perda de massa, por se tratar do polímero composto apenas por monômeros de HB. O PHBV apresentou apenas uma etapa de perda de massa devido à taxa de aquecimento, levando à sobreposição dos picos apresentados pela DTG nas diferentes etapas de degradação dos monômeros de HB e HV. Segundo LI, YU e CHEUNG (2001), quanto maior a taxa de aquecimento menor a sensibilidade de detecção dos diferentes compostos.

A partir dos termogramas, observa-se que os suportes PHB (Figura 41) e PHBV (Figura 42) mantiveram a estabilidade térmica na faixa de 25 a ~300 °C, a partir disso, ambos apresentaram instabilidade, com expressiva perda de massa ~99%. No processo de degradação térmica dos polihidroxialcanos a perda de massa pode ser

devido à decomposição ou rompimento das cadeias que constituem o suporte polimérico (Singh e Mohanty, 2007).

A análise térmica para o derivado ST-DVB-LBc apresentou três estágios de perda de massa como mostra a Figura 43. Na região I, de 25 a 175 °C, é observado a perda de massa de 1,83%, relacionado a evaporação da água atrelada provavelmente à lipase. A região II, de 175 a 380 °C, apresenta perda de massa de 16,76%, possivelmente devido a degradação de compostos orgânicos da lipase adsorvida pelo suporte. Na região III, 380 a 600 °C, ocorre a degradação dos compostos poliméricos do ST-DVB de com perda de massa de 69,26 %.

Figura 43: Curvas da TGA e DTG para o suporte de ST-DVB e seu derivado ST-DVB-LBc.



Fonte: Autoria própria.

O termograma do derivado ST-DVB-LBc mostra que houve deslocamento na curva de degradação da lipase. A DTG indica que o pico de degradação da lipase livre está a 319 °C, de maneira análoga, quando comparamos ao suporte puro, o derivado apresenta um pico adicional em ~331 °C que possivelmente seja devido a presença da lipase, que sofreu deslocamento térmico de ~10 °C devido as interações entre o suporte e a lipase que proporcionou maior resistência térmica aos compostos da estrutura da lipase.

O ST-DVB puro apresenta na região I perda de massa relacionada à água ligada a superfície do suporte e região II que possivelmente há sobreposição dos picos dos diferentes compostos devido a taxa de aquecimento. O suporte apresenta pouca variação em sua massa inicialmente no intervalo de 25 a 370 °C, a partir de então, há degradação dos materiais poliméricos (ST e DVB) e dos grupos C-C formados pelo processo de polimerização de 370 a 600 °C, apresentando perda de massa de 89,2 %, sendo o maior pico de degradação identificado pela DTG em 453 °C. A estabilidade térmica do polímero é maior à medida que a quantidade de monômeros de DVB aumenta, portanto no primeiro estágio de perda de massa do polímero há a degradação do monômero de ST em ~370 °C, seguido da degradação do DVB e dos grupos C-C formados à ~500 °C (Nakagawa; Tsuge, 1985; Yang *et al.*, 2004; Ilaiyaraja *et al.*, 2013).

É possível concluir que os suportes de PHB e ST-DVB oferecem maior estabilidade térmica para a lipase na região analisada (25 a 200 °C), onde observou-se menor perda de água para a lipase comparada em sua forma livre. A maior estabilidade proporcionada a lipase pode estar relacionada a superfície adequada para imobilização, que estabiliza a estrutura da lipase, protegendo-a do meio externo que causam danos à estrutura terciária da lipase evitando desestabilização da lipase, como a exposição direta a altas temperaturas (Badgujar; Bhanage, 2015).

O suporte de PHBV apresentou diferenças nas curvas térmicas da TGA significativas antes e após a imobilização, que não possibilitaram respostas conclusivas sobre as mudanças causadas pelas imobilização. Portanto para auxiliar na análise térmica de TGA foram realizadas análises de DSC para verificar se houve mudanças nas curvas térmicas para o derivado PHBV que fosse possível confirmar a presença da lipase, assim como para os derivados de PHB-LBc e ST-DVB-LBc.

4.4.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Após a análise térmica da TGA, as amostras foram submetidas a análise térmica de DSC para obter informações sobre as mudanças físicas e químicas que envolvem processos de absorção de calor ou endotérmicos (ENDO) e perda de calor ou exotérmicos (EXO) ocorridas no suportes antes e após a imobilização. O comportamento térmico dos derivados na presença de aditivos que proporcionaram maior atividade hidrolítica ao derivado também foi analisado . Através da área da

curva térmica foi possível identificar os valores de entalpia em cada região presentes na Tabela 10.

Tabela 10: Tabela de variação de entalpia (ΔH) entre o suporte, derivado-LBc e derivado-LBc-aditivo.

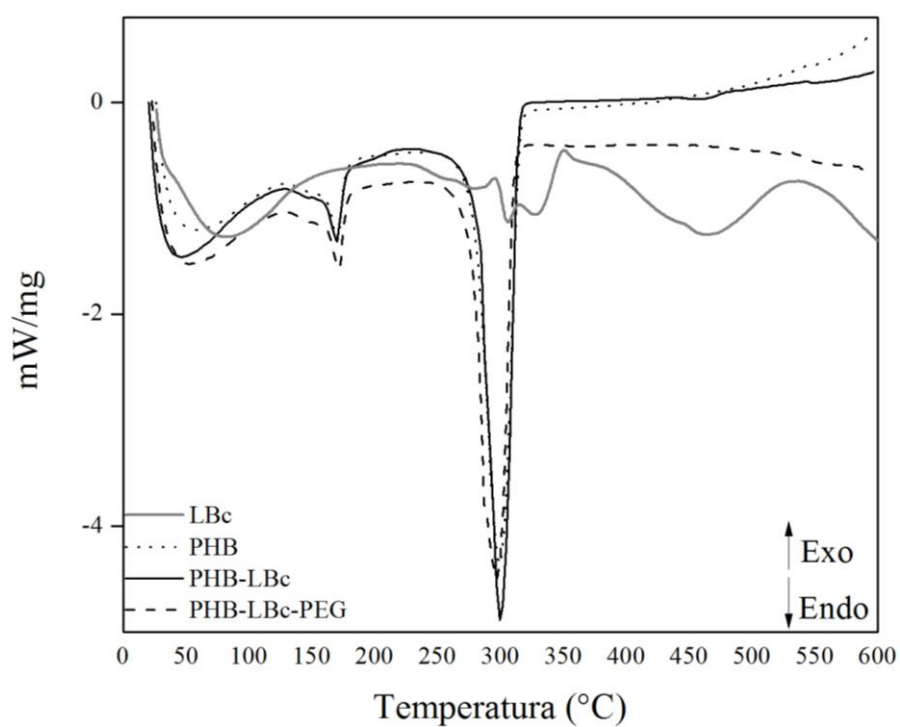
Amostras	T (°C)	ΔH (J/g)	T (°C)	ΔH (J/g)	T (°C)	ΔH (J/g)
PHB	26 - 127,67	313,9	150,3 - 187,9	31,22	247,5 - 322,8	580,7
PHB-LBc	20,5 - 125,2	381,1	127,7 - 185,4	29,98	235,1 - 320,4	596,5
PHB-LBc-PEG	23,1 - 125,2	395,1	130,22 - 192,9	33,01	247,5 - 315,4	633,6
PHBV	25,8 - 112,6	166	157,8 - 190,4	24,21	250,1 - 325,4	465,4
PHBV-LBc	23 - 110,1	175	157,9 - 187,9	25,95	247,6 - 325,5	561,9
PHBV-LBc-PEG	21 - 117,7	254	157,9 - 187,9	30,85	250,1 - 327,8	594,3
ST-DVB	25,4 - 207,4	438	-	-	384,6 - 475,4	178,1
ST-DVB-LBc	23,7 - 195,6	658,6	252,5 - 275	9,5	330,6 - 473,5	298
ST-DVB-LBc-PEG/TX	24,2 - 210	708,1	-	-	357,5 - 488,1	596,9

Fonte: Autoria própria.

A Figura 44 mostra o comportamento térmico para o suporte de PHB, derivado de PHB-LBc e lipase livre. As variações apresentadas pelas curvas térmicas indicam alterações químicas e físicas que ocorreram no suporte após a imobilização. A mudança na entalpia para o PHB de 313,9 J/g para 381,1 J/g após a imobilização, pode ter ocorrido devido a presença da lipase no suporte. Após a adição do aditivo na imobilização, a entalpia do derivado PHB-LBc mudou de 381,1 J/g para 395,1 J/g (PHB-LBc-PEG).

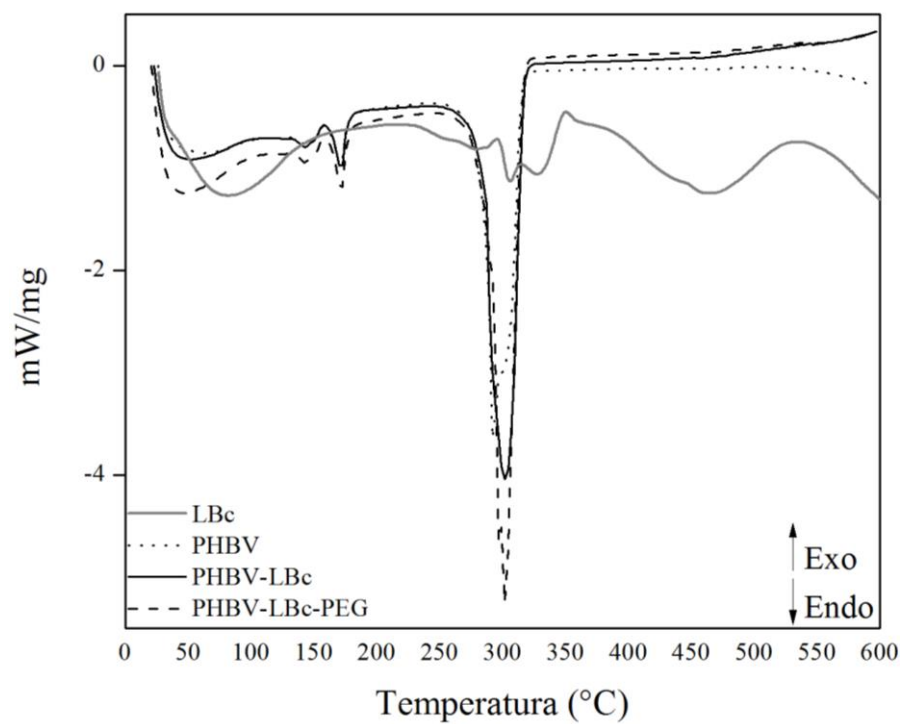
Comportamento térmico similar ao do polímero PHB, foi apresentado pelo PHBV como mostra a Figura 45 com aumento da entalpia após a imobilização, passando de 166 J/g para 176,7 (PHBV-LBc). Na presença do aditivo durante a imobilização o derivado PHBV-LBc-PEG apresentou entalpia de 254 J/g. O aumento dos valores podem estar associados a maior quantidade de energia requerida para que ocorra a mudança de fase no derivado na presença da lipase e do aditivo (Souza *et al.*, 2014). A região que ocorre as mudanças de entalpia para os suportes de PHB e PHBV é formada pela área do pico endotérmico entre 25 a 150 °C associadas a absorção de energia das moléculas de água presentes na superfície do suporte e da lipase.

Figura 44: Curva de DSC para o polímero PHB, derivado PHB-LBc e lipase livre.



Fonte: Autoria própria.

Figura 45: Curva de DSC para o polímero PHBV, derivado PHBV-LBc e LBc livre.

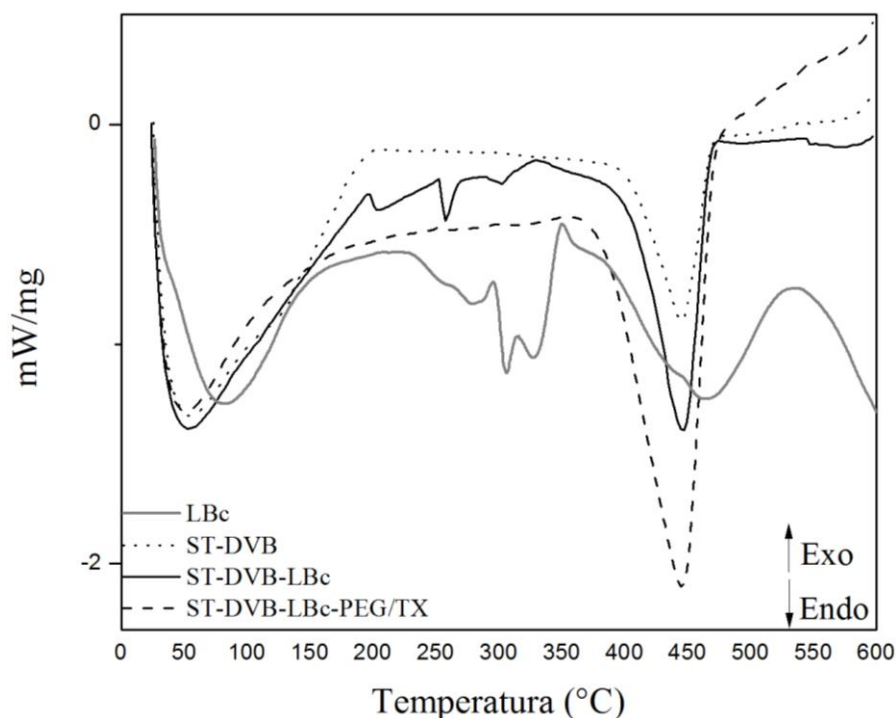


Fonte: Autoria própria.

O pico endotérmico à ~ 170 °C para o PHB, representa o ponto de fusão dos monômeros de HB, as mudanças na intensidade do pico para o derivado-LBc pode estar atreladas a presença da lipase ao suporte, que mudou a intensidade de absorção de energia (Mohanrasu *et al.*, 2020). Os picos endotérmicos apresentados pelo polímero de PHBV formados em 143 e 170 °C correspondem ao ponto de fusão dos monômeros de HV e HB, respectivamente, que possuem ponto de fusão diferentes. O pico endotérmico na região de ~ 300 pode estar relacionados a degradação dos polímeros de PHB e PHBV e seus derivados na ausência e presença de aditivo (Lai *et al.*, 2004; Gunaratne; Shanks, 2005).

A Figura 46 mostra o comportamento térmico para o polímero ST-DVB. É possível observar a variação na curva do ST-DVB-LBc quando comparadas ao polímero antes da imobilização. A curva endotérmica apresentada pelo suporte após a imobilização mostra aumento da entalpia passando de 438 J/g para 658 J/g, mostrando que houve mudanças na absorção de energia após a imobilização. Além disso o derivado apresenta pico adicional endotérmico a 250 °C, possivelmente devido as transformações relacionadas à lipase, como a perda da água ligada ao sítio ativo.

Figura 46: Curva de DSC para o polímero PHB, derivado PHB-LBc e LBc livre.



Fonte: Autoria própria.

A curva térmica apresentada pelo suporte-LBc na presença do aditivo é maior que a curva apresentada pelo derivado-LBc em ~ 50 °C, isso faz com que haja aumento da entalpia de 708,1 J/g para 432 J/g. Como discutido anteriormente a mudança para entalpias maiores favorecem rigidez da lipase, conferindo maior estabilidade térmica. Os picos adicionais apresentados pelo derivado na ausência dos aditivos em ~ 250 °C não são observados pelo derivado com aditivos, o que remete a maior estabilidade da lipase a maiores temperaturas.

Não há informações na literatura a respeito do ponto de fusão do copolímero de ST-DVB. O polímero poliestireno possui ponto de fusão a 243 °C (Lemstra; Kooistra; Challa, 1972). Como nenhum pico foi observado na curva da DSC para o ST-DVB, utilizando como base o valor da temperatura de fusão do poliestireno, é possível que o ponto de fusão seja próximo da degradação dos componentes do polímero, ficando sobreposto na região de 360 a 480 °C

De acordo com TURNER e VULFSONT (2000), as lipases necessitam de quantidade mínima da água ligada no centro ativo para que possam ocorrer a catálise. Os autores afirmam que até 200 °C as lipases não perdem a água ligada, apenas a água livre presente na superfície, até essa temperatura os aminoácidos presentes nas estruturas da lipase sofrem poucas alterações, não desnaturando. Portanto a ausência dos picos na presença dos aditivos PEG e TX, podem ter proporcionado maior estabilidade com o aumento da temperatura. De acordo com os resultados apresentados pelas curvas do DSC, os suportes de PHB, PHBV e ST-DVB proporcionaram maior estabilidade térmicas a LBc.

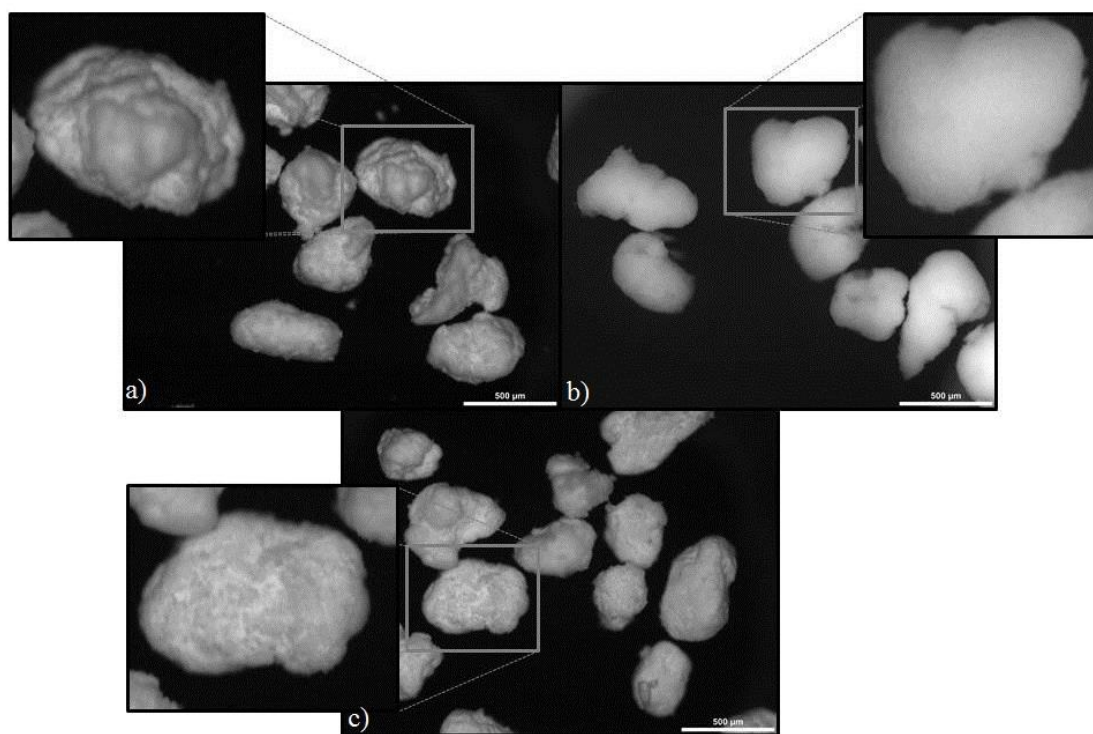
4.4.3. Microscopia Ótica

A partir das imagens obtidas por microscopia ótica foi possível analisar a morfologia da superfície dos suportes poliméricos avaliando as mudanças ocorridas durante as diferentes etapas na adsorção da lipase ao suporte. As Figura 47, 48 e 49 mostram a morfologia das superfícies dos suportes (a) antes da imobilização, (b) suporte imerso em solução de álcool etílico (95%v/v) e (c) o suporte após a imobilização.

O suporte de PHB antes e após a imobilização, Figura 47 (a) e (c), não apresentou nas imagens obtidas através de microscopia ótica nenhuma variação perceptível em sua morfologia. Porém, durante a etapa de imersão em solução

alcoólica o polímero apresentou mudanças na morfologia da superfície, como podemos observar na Figura 47 (b). O suporte apresenta superfície com menor rugosidade e de aspecto aveludado, quando comparada ao suporte antes e após a imersão em álcool.

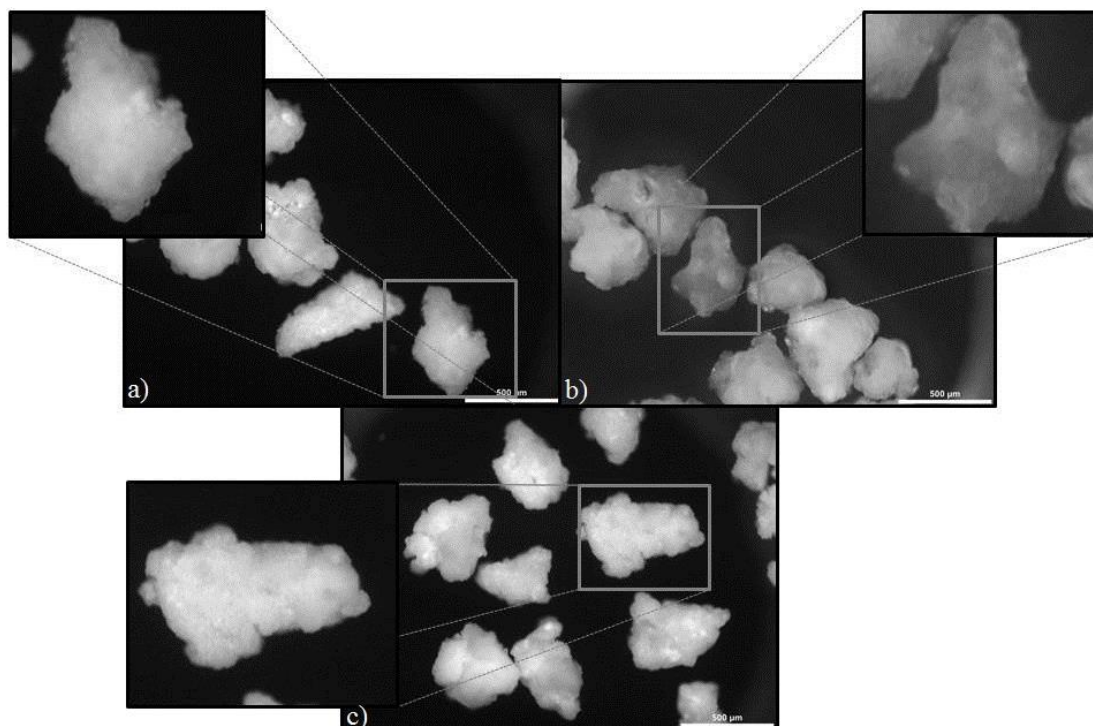
Figura 47: Microscopia ótica dos grãos do polímero PHB (a) antes da imobilização, (b) em solução de álcool etílico e (c) após a imobilização.



Fonte: Autoria própria.

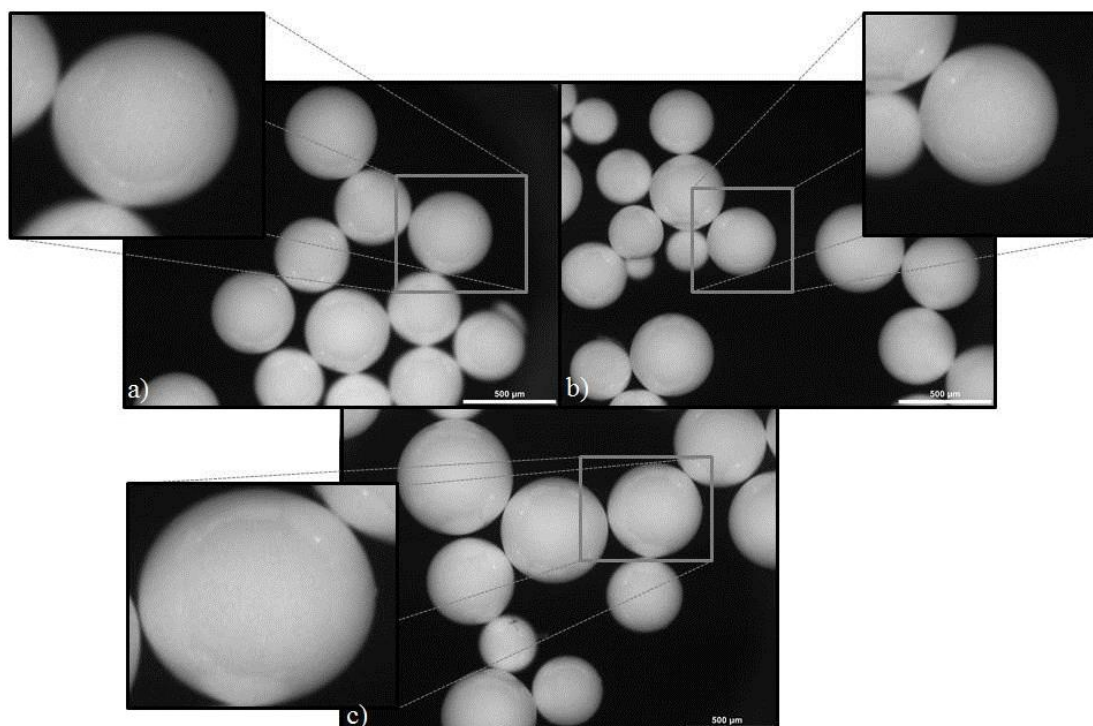
A Figura 48 (a) e (c), mostra o suporte de PHBV antes e após a imobilização. Não foi possível identificar nenhuma variação na estrutura da superfície do polímero nessas etapas. Quando o suporte foi imerso em solução alcoólica, como mostra a Figura 48 (b), não apresentou mudanças expressivas como para o PHB. Em contrapartida o suporte de ST-DVB não apresentou nenhuma mudança perceptível na morfologia superficial nenhuma etapa analisadas por microscopia ótica como mostra a Figura 49.

Figura 48: Microscopia ótica dos grãos do polímero PHBV (a) antes da imobilização, (b) em solução de álcool etílico e (c) após a imobilização.



Fonte: Autoria própria.

Figura 49: Microscopia ótica dos grãos do polímero ST-DVB (a) antes da imobilização, (b) em solução de álcool etílico e (c) após a imobilização.

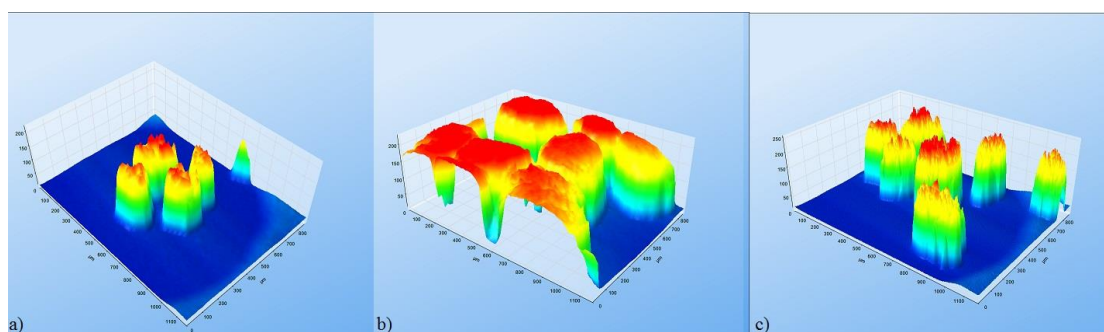


Fonte: Autoria própria.

Para confirmar se houveram mudanças nas morfologias dos polímeros, novas imagens em 3D da superfície dos suportes foram obtidas. Podemos confirmar algumas mudanças ocorridas nas superfícies dos polímeros como mostram as Figuras 50, 51 e 52, para o PHB, PHBV e ST-DVB, respectivamente.

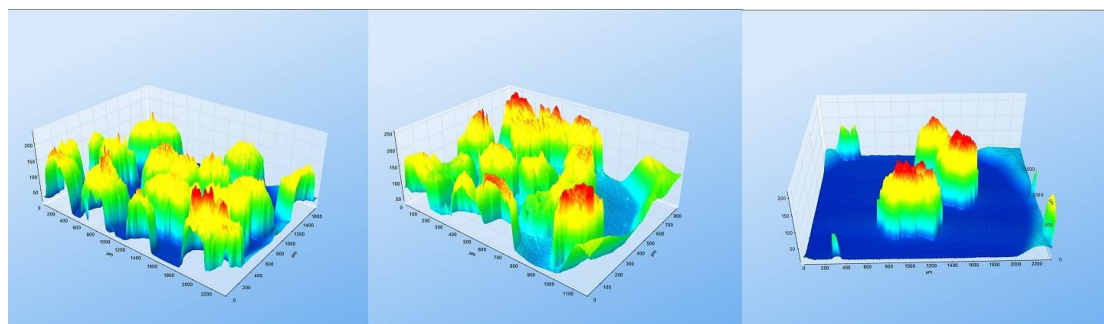
Ao analisar a Figura 50, foi possível notar a mudança na superfície do polímero de PHB em contato com a solução alcoólica (Figura 50 b), quando comparado ao polímero antes (Figura 50 a) e após a imobilização (Figura 50 c), a superfície passa a apresentar aspecto liso e arredondada. Entretanto, após a imobilização o suporte volta a ter as características superficiais observadas antes da imersão em solução alcoólica. As Figuras 51 e 52 para os suportes de PHBV e ST-DVB não apresentaram nenhuma mudança considerável para a superfície dos suportes em nenhuma das etapas analisadas.

Figura 50: Imagens 3D do suporte de PHB (a) antes da imobilização, (b) imerso em solução de álcool etílico (95% v/v) e (c) (após a imobilização).



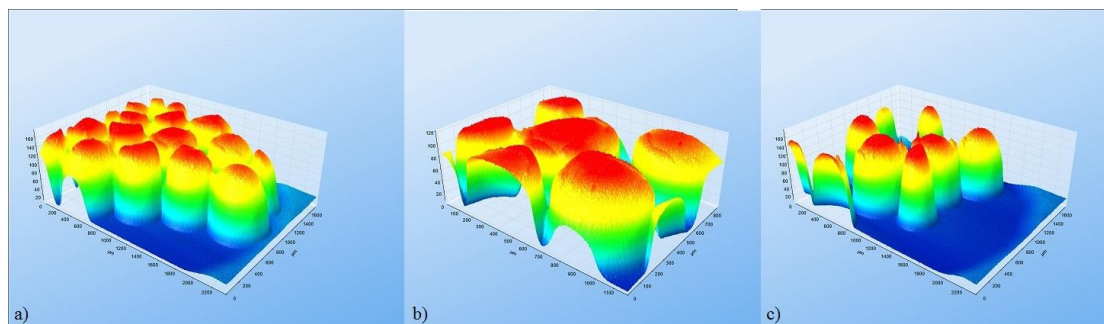
Fonte: Autoria própria.

Figura 51: Imagens 3D do suporte de PHBV (a) antes da imobilização, (b) imerso em solução de álcool etílico (95% v/v) e (c) (após a imobilização).



Fonte: Autoria própria.

Figura 52: Imagens 3D do suporte de ST-DVB (a) antes da imobilização, (b) imerso em solução de álcool etílico (95% v/v) e (c) (após a imobilização).



Fonte: Autoria própria.

Para verificar se houveram variações no tamanho das partículas em diferentes etapas da imobilização, foi realizada a análise de distribuição do tamanho das partículas a partir das imagens obtidas dos polímeros. Através da Tabela 11, podemos observar que o polímero PHB apresenta variação no tamanho das partículas com aumento em seu tamanho após a imersão em solução alcoólica que permaneceram após a imobilização.

Tabela 11: Variação do tamanho dos polímeros antes, em solução alcoólica e após a imobilização.

	PHB			PHBV			ST-DVB		
Variação (μm)	Puro (%)	S.A. (%)	Imo. (%)	Puro (%)	S.A. (%)	Imo. (%)	Puro (%)	S.A. (%)	Imo. (%)
0 – 100	-	-	-	-	-	-	-	9,93	4,90
100 - 200	-	-	-	-	-	-	6,90	33,49	34,64
200-300	-	-	-	-	-	-	55,16	31,36	36,60
300-400	36,51	5,63	15,75	4,08	7,94	6,65	31,47	15,29	21,24
400-500	42,86	47,50	44,09	42,86	36,21	32,01	4,31	9,93	2,62
500-600	20,63	34,37	29,13	32,65	43,89	44,79	2,16	-	-
600-700	-	12,50	11,03	20,41	11,96	16,55	-	-	-
700-800	-	-	-				-	-	-

Fonte: Autoria própria.

Para o PHBV houveram poucas alterações nos diâmetros das partículas, antes da imersão em solução alcoólica apresentavam maior quantidade entre os diâmetros de 400 e 500 μm , após a imersão foi observada aumento na quantidade de partículas entre 500 e 600 μm , que permaneceu após a imobilização. A distribuição do tamanho do diâmetro das partículas para o polímero de ST-DVB apresentou diminuição no tamanho de suas partículas após a imersão em solução alcoólica e permaneceu com as mesmas dimensões similares após a imobilização.

A variação no tamanho dos polímeros e a mudança superficial estão relacionadas a difusão do álcool etílico entre os poros dos polímeros afastando os seguimento das cadeias poliméricas promovendo o “inchamento”. Isso explica o que possivelmente levou ao aumento nos suportes poliméricos PHB e PHBV. Vários critérios deve ser levados em consideração para que haja o distanciamento das cadeias do polímero como temperatura, tempo e principalmente a afinidade química (Sperling, 2006; Miller-Chou *et al.*, 2003).

No caso do ST-DVB o efeito contrário foi apresentado devido a menor afinidade com o solvente (álcool etílico). O ST-DVB possui características termorrígidas e o inchamento só ocorrerá em solventes de maior afinidades químicas como o grau de polaridade, caso contrário a superfície torna-se rígida e isso pode ter levado a diminuição do tamanho das partículas do polímero (Sperling, 2006; Miller-Chou *et al.*, 2003; Campelo; Machado, 2013; Pereira *et al.*, 2014). Estudo feito por ERMAN *et al.*, 1985 foi analisado o inchamento do poliestireno contendo 3% de divinilbenzeno em solução de ciclo hexano, tolueno e mistura de tolueno e metanol, foi observado que o inchamento do polímero em tolueno puro foi superior aos outros solventes.

FORESTI e FERREIRA (2004) observaram mudanças na estrutura do polipropileno, com alterações no diâmetro dos poros quando imerso em solução de álcool etílico a 95% (v/v), antes da imobilização. A dilatação dos poros e a mudança do volume da partícula de suporte auxilia o processo de adsorção da lipase no suporte, aumentando a área de superfície entre lipase-suporte.

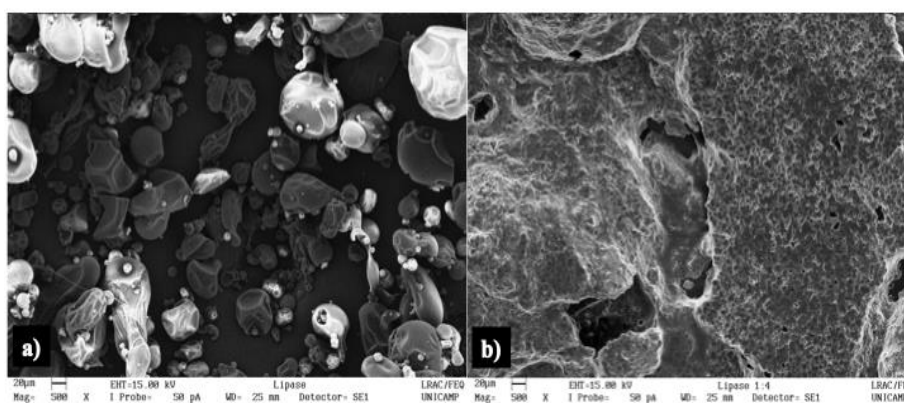
As mudanças na estrutura do polímero de PHB proporcionadas pela ação da solução alcoólica pode ter influenciado positivamente nos resultados de adsorção da lipase, devido ao aumento dos canais e poros presentes na estrutura do suporte. Já

para o PHBV mesmo a pequena mudança em seu tamanho pode não ter sido o bastante para superar o efeito negativo da alta hidrofobicidade do polímero.

4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos suportes puros, da LBC na forma livre e dos derivados foram analisados por MEV. Para a lipase comercial na forma livre, apresenta diferente distribuição no tamanho de partículas com formato globular definido e outras com formatos não definidos como mostra a Figura 53 (a). Após solubilização da lipase na solução tampão (anterior ao processo de imobilização), esta apresenta diminuição do tamanho, com distribuição mais homogênea como apresenta a Figura 53 (b). Essas observações corroboram com PADILHA *et al.*, (2018).

Figura 53: Morfologia da lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (a) e dissolvida em solução tampão (10 mM) (b). Aumento de 500x.



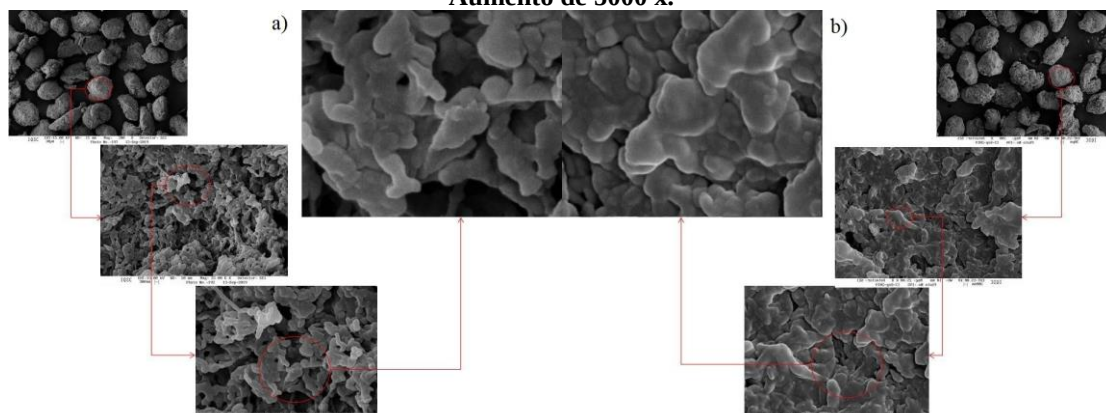
Fonte: Autoria própria.

A Figura 54 (a) mostra a superfície irregular do PHB puro, em que é possível observar um pouco mais de aspereza e protuberâncias em comparação ao derivado como mostra a Figura 54 (b). Após a imobilização, a morfologia da superfície do PHB apresentou modificações, a lipase foi adsorvida na superfície do suporte formando fina camada, provocando à diminuição nas cavidades e rugosidade da superfície (Figura 54 (b)).

A Figura 55 (a) mostra a superfície das partículas de PHBV aglomeradas e interconectadas por fibras do próprio material. Após a imobilização, a superfície do suporte de PHBV apresentou alterações que possivelmente ocorreram devido à presença da lipase adsorvida, formando filme sobre o suporte, observado através da cobertura dessas fibras que se unem aos aglomerados do suporte puro. Desta forma,

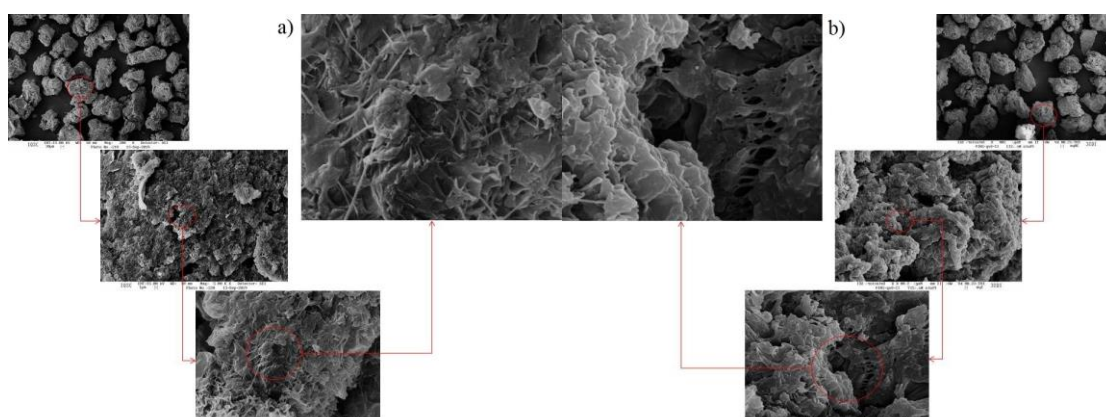
após a imobilização, não foi possível observar as fibras na superfície do material, como mostra a Figura 55 (b).

Figura 54: Análise morfológica da superfície do PHB antes (a) e após (b) a imobilização.
Aumento de 5000 x.



Fonte: Autoria própria.

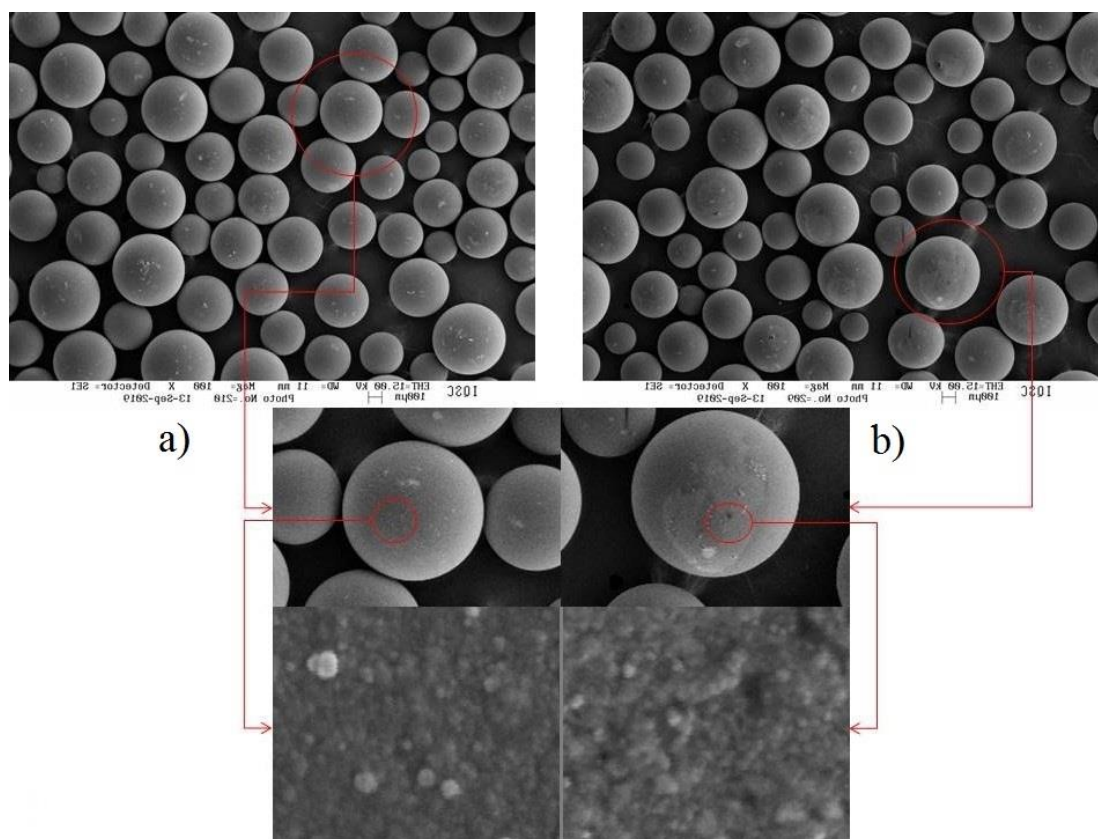
Figura 55: Análise morfológica da superfície do PHBV antes (a) e após (b) a imobilização.
Aumento de 5000 x.



Fonte: Autoria própria.

As imagens do suporte de ST-DVB foram comparadas antes e após a imobilização. Assim como nas imagens de microscopia óptica, não foi possível observar diferenças significativas na morfologia da superfície dos suportes antes e após a imobilização, mesmo utilizando maior amplificação da imagem. Em menor ampliação, observa-se esferas de ST-DVB, com formatos bem definidos, antes e após a imobilização (Figura 56(a)). Contudo, as micrografias mostram manchas esbranquiçadas em algumas regiões da superfície do suporte após a imobilização (Figura 56(b)). Isto pode estar relacionado à adsorção da lipase na superfície.

Figura 56: Análise morfológica da superfície do ST-DVB antes (a) e após (b) a imobilização. Aumento de 5000 x.



Fonte: Autoria própria.

A modificação morfológica, pela possível presença de LBC, nos suportes de PHB e PHBV também foi evidenciada por OZMEN, SEZGIN e YILMAZ (2009) que imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em suporte polimérico de β -ciclodextrina. Antes da imobilização o suporte polimérico apresentou cavidades em sua superfície, as quais diminuíram após a imobilização, tornando-a arredondada.

O estudo da morfologia da superfície do agár-agár utilizado na imobilização da pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 foi realizado por REHMAN *et al.* (2014). Os autores observaram que os poros da superfície dos suportes, após a imobilização, foram cobertos. DIZGE, KESKINLER e TANRISEVEN (2009) analisaram a morfologia da superfície do ST-DVB na presença e ausência da lipase de *Thermomyces lanuginosus*.

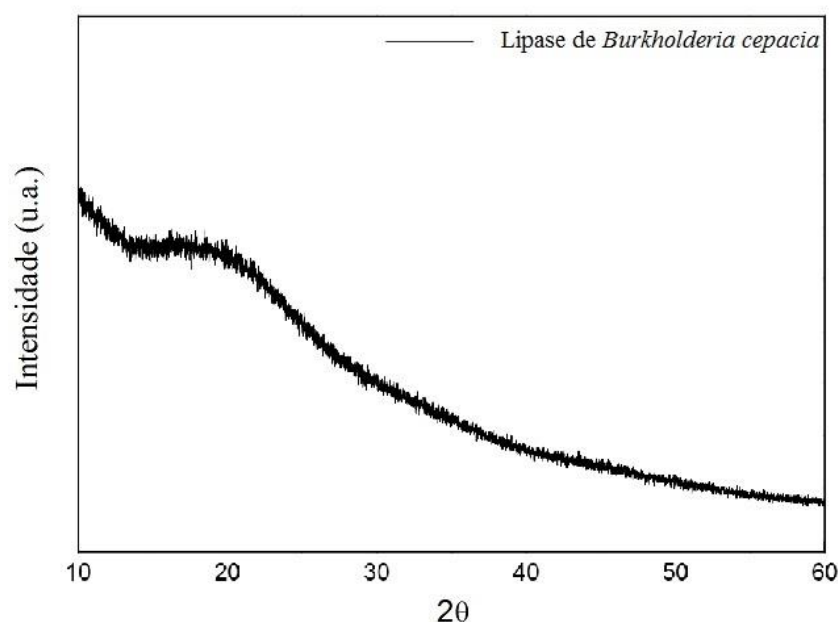
Análises de MEV mostraram que após a imobilização formou-se filme de lipase sobre a superfície do suporte, que é totalmente poroso, cobrindo-os. A superfície irregular e/ou rugosa apresentada por DIZGE, KESKINLER e

TANRISEVEN (2009) não é notada nas micrografias apresentadas neste projeto. Todavia, o aparecimento das manchas esbranquiçadas apresentadas no ST-DVB-LBc podem estar relacionadas com a cobertura dos poros observadas pelos autores.

4.4.5. Difratometria de raios X

As regiões cristalinas e amorfas da lipase e dos suportes poliméricos puros PHB, PHBV e ST-DVB e dos derivados foram analisadas entre 5 a 80° (2 θ). O difratograma apresentado (Figura 57) da LBc livre indicam regiões totalmente amorfas, esses resultados corroboram com os encontrados por DHAKE *et al.* (2013).

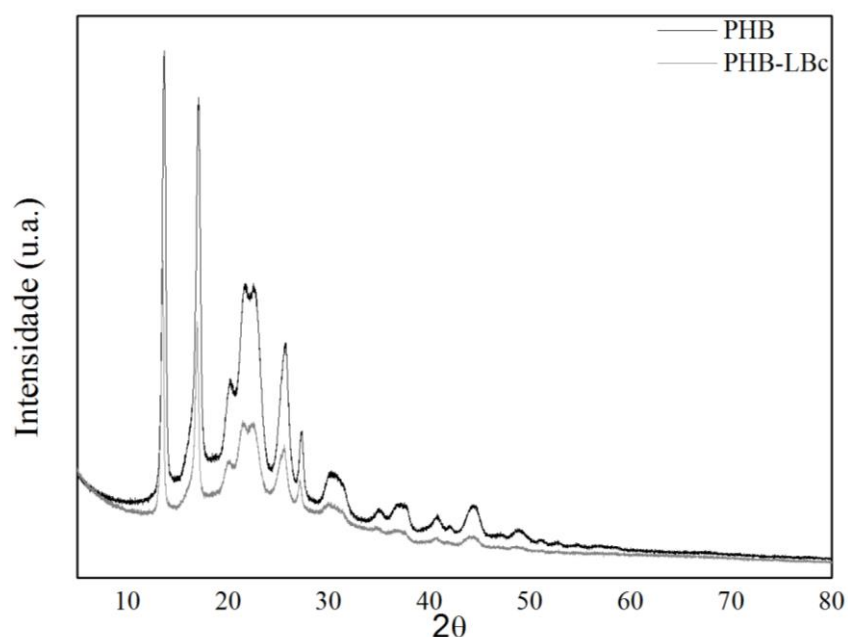
Figura 57: Difrátograma da lipase de *Burkholderia cepacia*.



Fonte: Autoria própria.

Os difratogramas para as amostras PHB (Figura 58) e PHBV (Figura 59) apresentam reflexões bem definidas indicando a presença de fases cristalina dos suportes puros. Com picos proeminentes em 13,6°, 17,1°, 20,3°, 21,7°, 22,7°, 25,7, 27,1, de acordo com THIRÉ, ARRUDA e BARRETO (2011), os picos correspondem aos respectivos planos (020), (110), (101), (111), (121) e (002).

Figura 58: Difratoograma do suporte PHB puro e imobilizado.



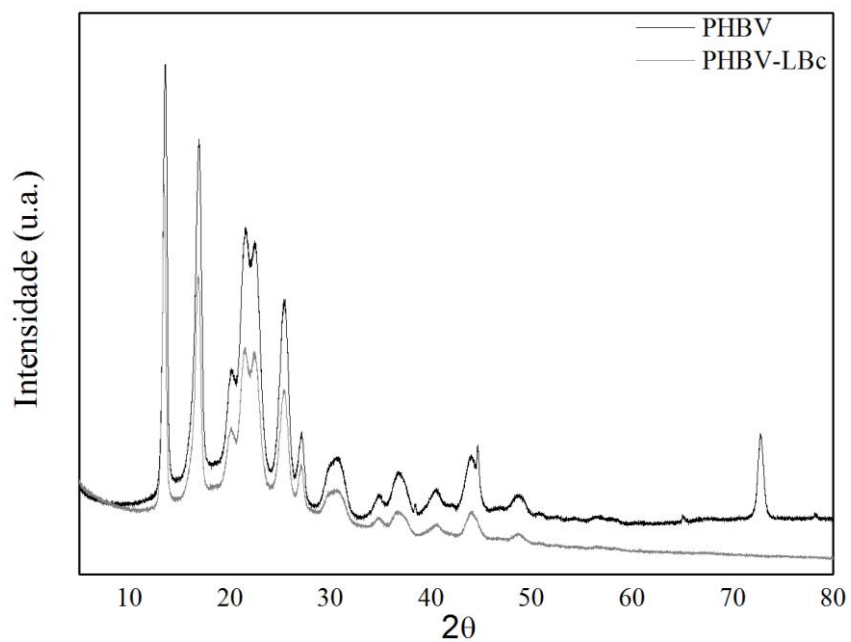
Fonte: Autoria própria.

Um pico a $2\theta = 72,3^\circ$ foi observado para o PHBV puro e foi alterado para o derivado provavelmente pela interação física entre o suporte e a lipase que ocorre entre as regiões amorfas da lipase e cristalinas do suporte polimérico. Este comportamento pode estar relacionado a presença da LBc nos suportes poliméricos que diminuindo o grau de cristalinidade dos polímeros após a imobilização, esta observação corrobora com os resultados de SENHORINI *et al.* (2012) na encapsulação do óleo de andiroba em PHBV. Materiais poliméricos com regiões cristalinas apresentam maior resistência mecânica e proporcionam maior estabilidade operacional do biocatalisador, evitando o rompimento das partículas nas reações de biocatálise, principalmente quando se utiliza agitação no processo (Fernandes *et al.*, 2014).

Os difratogramas do ST-DVB puro e do seu derivado (Figura 60) indicam regiões predominantemente amorfas tanto no polímero quanto no derivado. Entretanto, o difratograma para a amostra imobilizada apresenta diminuição na região amorfa e um princípio de cristalinidade. Esse resultado apresenta alteração considerável após o processo de imobilização por adsorção física, mostrando que ocorreram modificações após o contato do suporte polimérico com a LBc. Picos de pequenas intensidades nas regiões de 2θ : $13,7^\circ$, $17,1^\circ$ e $\sim 40^\circ$ foram observados no derivado, mostrando claramente a alteração do difratograma com a adsorção física da

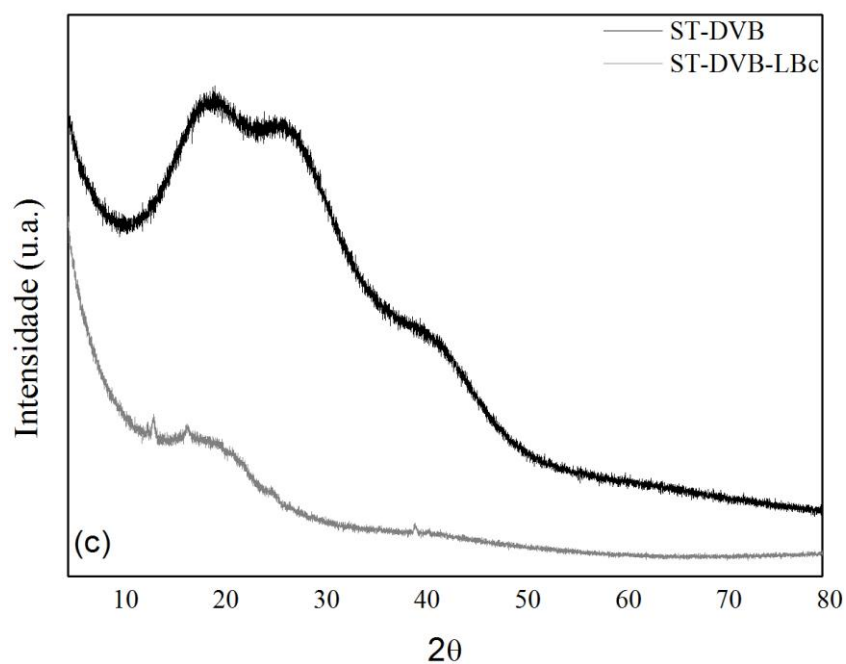
LBc ao ST-DVB.

Figura 59: Difratoograma do suporte PHBV puro e imobilizado.



Fonte: Autoria própria.

Figura 60: Difratoograma do suporte ST-DVB puro e imobilizado.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados apresentados indicam alteração considerável após o processo de imobilização por adsorção física em todos os suportes poliméricos, ou seja, ocorreram modificações após o contato do suporte polimérico com a LBc. Picos de pequenas

intensidades nas regiões de 2θ : $13,7^\circ$, $17,1^\circ$ e $\sim 40^\circ$ foram observados no derivado, mostrando claramente a alteração do difratograma com a adsorção física da LBC ao ST-DVB.

Diversas técnicas foram utilizadas em conjunto para caracterizar os derivados obtidos neste trabalho. Inicialmente a caracterização de razão suporte:lipase, temperatura, velocidade de agitação e pH, apresentaram as melhores condições para a hidrólise dos lipídeos do azeite de oliva. O estudo da influência dos aditivos contribuíram para o aumento do rendimento e atividade hidrolítica dos derivados. As análises de FTIR permitiram observar a presença da lipase nos derivados. As mudanças apresentadas pelos termogramas (DTG e DSC), além de confirmarem a presença da lipase nos suportes, mostraram que a lipase quando imobilizada, apresenta maior estabilidade térmica.

A avaliação da morfologia das superfícies dos suportes antes e após a imobilização, contribuíram para que fosse possível observar as mudanças ocorridas relacionadas a presença da lipase adsorvida nos suportes. Os difratogramas apresentados pelos derivados, mostraram que a imobilização não faz alterações consideráveis na estrutura dos suportes, isso supõe que seja mantidas suas resistências mecânicas e químicas mesmo após a imobilização.

5. PERSPECTIVA

Afim de aprimorar o protocolo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* proposto neste trabalho, algumas caracterizações poderiam ser adicionadas para maior eficiência em atividade hidrolítica e obtenção do derivado. Serão listadas a seguir:

- A avaliação da influência do tempo necessário para que seja possível maior eficiência na imobilização, poderia aumentar o rendimento do catalisador. Alguns autores relatam que o tempo de contato entre o suporte e a solução enzimática influencia diretamente no carregamento de enzima no suporte (Li *et al.*, 2018; Asmat; Husain, 2018)
- Visto que alguns sais e solventes podem afetar no desempenho da atividade hidrolítica da lipase imobilizada, o estudo de diferentes soluções tampão, pH e solventes poderiam avaliados para dissolver a lipase em pó na adsorção física

nos suportes, verificando suas influências na imobilização (Blanco *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2015).

- A avaliação da estabilidade operacional, ou seja, quantas vezes seria possível a reutilização do derivado quando aplicado à biotransformação. Tendo em vista que a imobilização permite a reutilização da enzima, o que onera o uso como catalizador (Souza *et al.*, 2014; Yang; Zhang, 2019).
- A avaliação das concentrações dos aditivos, pois afetam diretamente nos resultados da imobilização (Rios *et al.*, 2018; Yang; Zhang, 2019).
- Avaliação da influência de outros solventes para abertura dos canais e poros dos suportes. As análises de MO mostraram que os suportes quando imerso em solução alcoólicas podem sofrer inchamento, isso pode auxiliar no aumento da difusão da lipase nos suportes. Visto que o álcool etílico não apresentou mudanças significativas para os suportes de PHBV e ST-DVB, outros solventes poderiam ser testados e estudados verificando se há maior rendimento na imobilização (Sperling, 2006; Miller-Chou *et al.*, 2003).
- Análises como volume de poros e área superficial, assim como a avaliação do grau de hidrofobicidade dos suportes, ajudariam na melhor compreensão dos resultados obtidos neste trabalho (Souza *et al.*, 2017; Simon *et al.*, 2018; Abahazi *et al.*, 2018; Velicic *et al.*, 2020).
- Técnicas como a espectroscopia de Raman e UV-VIS poderiam ser adicionadas à caracterização instrumental para melhor identificação dos compostos que formam o derivado e sua quantificação, respectivamente. Isso ajudaria a confirmar a presença da lipase e descobrir com maior precisão a quantidade de lipase presente nos suportes (Souza *et al.*, 2014; Yang; Zhang, 2019).
- Os derivados obtidos a partir da LBc nos suportes de PHB e ST-DVB poderiam ter seus desempenhos avaliados na produção de bioprodutos em diversos seguimentos como alimentícios, fármacos, cosméticos e de biocombustíveis (Zhang; He; Simpson, 2018; Rios *et al.*, 2018; Rehm; Chen; Rehm, 2018; Basso; Serban, 2019)

6. PUBLICAÇÕES

As análises realizadas neste trabalho permitiram a produção dos seguintes trabalhos:

- Publicação:

JOURNAL OF MICROENCAPSULATION
2019, VOL. 36, NO. 4, 327–337
<https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1626927>



ORIGINAL ARTICLE



Alternative method to improve the ethyl valerate yield using an immobilised *Burkholderia cepacia* lipase

Wellington Correa Moreira^a, Alfredo Luís Pereira Elias^a, Wislei Riuper Osório^{a,b} and Giovana Silva Padilha^a

^aSchool of Applied Sciences/FCA, Research Group in Manufacturing of Advanced Materials (CPMMA), University of Campinas (UNICAMP), Limeira, Sao Paulo, Brazil; ^bSchool of Technology, University of Campinas, Limeira, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

This study is focussed on a biocatalysing chemical synthesis in order to produce a green apple flavour (ethyl valerate) using an immobilised lipase from *Burkholderia cepacia*. A strategy to improve the lipase stability during the esterification is used. In order to increase the ethyl valerate efficiency, an alternative method using the buffer pH to dissolve the lipase into alginate is proposed. Parameters of the immobilised lipase such as pH, temperature, activation energy and stirring speed are evaluated. The optimal condition using the substrate concentration and the lipase loading is provided. After 5 recyclability cycles, the immobilised lipase reveals a decreasing ~25% in the ethyl valerate yield. An economical ester synthesising associated with the esterification efficiency is evidenced. This induces that a potential industrial application can be considered. This due to the demand for ethyl valerate in the flavour industry is required.

ARTICLE HISTORY

Received 22 January 2019
Accepted 28 May 2019

KEYWORDS

Burkholderia cepacia lipase; immobilisation; sodium alginate; ethyl valerate

- Anais de congresso:

XXII National Bioprocesses Symposium (SINAFERM) XIII Enzymatic Hydrolysis of Biomass Symposium (SHEB)

08/07/2020 EFFECT OF GLUTARALDEHYDE, POLY (ETHYLENEGLICOL) AND TRITON X- 100 AN IMMOBILIZED *Burkholderia cepacia* LIPASE ...



SINAFERM SHEB 2019

ISSN: 2447-2816

Login (/user/login/ashnaz)

EFFECT OF GLUTARALDEHYDE, POLY (ETHYLENEGLICOL) AND TRITON X- 100 AN IMMOBILIZED *Burkholderia cepacia* LIPASE

Wellington Moreira Correa (Wellington Moreira Correa) (/sinaferm-sheb-2019/autores/wellington-moreira-correa)¹

WISLEI RIUPER RAMOS OSORIO (WISLEI RIUPER RAMOS OSORIO) (/sinaferm-sheb-2019/autores/wislei-riuper-ramos-osorio)²

Ausdinir Danilo Bortolozo (Ausdinir Danilo Bortolozo) (/sinaferm-sheb-2019/autores/ausdinir--danilo-bortolozo)³

Giovana da Silva Padilha (Giovana da Silva Padilha) (/sinaferm-sheb-2019/autores/giovana-da-silva-padilha)²

- 10684 2

Pôster

Download (/user/login/ashnaz?destination=/sinaferm/sinaferm-sheb-2019/papers/effect-of-glutaraldehyde--poly--ethyleneg

☆ (/user/login/ashnaz?destination=/proceedings/100085/_papers/104118/favorite) ✉ (/user/login/ashnaz?destination=/proceedings/100085/_papers/104118/r

HOW TO CITE THIS PAPER?

Abstract

Commercial lipase from *Burkholderia cepacia* was immobilized on polymeric and non-polymeric supports provided by a physical absorption. As polymeric support, polyhydroxybutyrate (PHB), polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV) and Diaion HP-20 were used; and as non-polymeric supports silica gel and activated charcoal. Silica gel and activated charcoal decreased slightly the lipase activity. The polymeric supports presented more favorable activities values. For increasing the immobilized lipase activity, glutaraldehyde, poly (ethylene glycol) and Triton X-100 were tested. The lipase-PHB better activity was reached by using PEG. The lipase-Diaion, by using mixed of PEG and Triton X-100, the yield activity increased. Compared with the free lipase, the lipase-PHB-HV had decreased yield when glutaraldehyde, PEG and Triton X-100 were used. The micrographs of raw supports, after alcohol treatment (before immobilization) and immobilized lipase were characterized.



Questions



ENCAPSULATION AND PHYSICAL ADSORPTION OF *Burkholderia cepacia* LIPASE IMMOBILIZED BY ALGINATE AND POLYHYDROXYBUTYRATE

Wellington Moreira Correa (Wellington Moreira Correa) (/sinaferm-sheb-2019/autores/wellington-moreira-correa)¹

Alfredo Luis Pereira Elias (Alfredo Luis Pereira Elias) (/sinaferm-sheb-2019/autores/alfredo-luis-pereira-elias)¹

Ausdinir Danilo Bortolozo (Ausdinir Danilo Bortolozo) (/sinaferm-sheb-2019/autores/ausdinir---danilo-bortolozo)¹

WISLEI RIUPER RAMOS OSORIO (WISLEI RIUPER RAMOS OSORIO) (/sinaferm-sheb-2019/autores/wislei-riuper-ramos-osorio)¹

Giovana da Silva Padilha (Giovana da Silva Padilha) (/sinaferm-sheb-2019/autores/giovana-da-silva-padilha)¹

- 107004

Poster

Download (/user/login/ashnazg?destination=/sinaferm/sinaferm-sheb-2019/papers/encapsulation-and-physical-adsorption-of

☆ (/user/login/ashnazg?destination=/proceedings/100085/_papers/104143/favorite) ✉ (/user/login/ashnazg?destination=/proceedings/100085/_papers/104143/r

HOW TO CITE THIS PAPER?

Abstract

Burkholderia cepacia lipase is immobilized by encapsulation and physical adsorption using alginate (ALG) and polyhydroxybutyrate (PHB). This study is focused on to combine suitable enzymatic activity with the easy methods of the lipase immobilization, once different supports convert distinctive lipase behavior. The results demonstrate that the immobilized lipase in ALG lead to optimal hydrolytic activity at 40 °C, pH 7 and 150 rpm. The lipase immobilized on PHB reveals at 70 °C, pH 8 and 250 rpm their corresponding best activities. The activation energy of the lipase immobilized on PHB shows values of about 3.5 times higher than the lipase encapsulated in alginate.



Questions

- Submissão do artigo:

Physical adsorption used to the immobilization of Burkholderia cepacia lipase into powder polymeric supports. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.

Em parceria com: Ausdinir Danilo Bortolozo; Wislei Riuper Osório e Giovana da Silva Padilha.

7. CONCLUSÃO

Foram estudados o comportamento da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em suportes poliméricos e não poliméricos. Melhores resultados foram obtidos a partir dos suporte poliméricos de PHB, PHBV e ST-DVB. Os catalisadores obtidos a partir da imobilização da LBC por adsorção física nos suportes poliméricos apresentaram comportamento distintos em suas caracterizações de carregamento de lipase, velocidade do agitador, temperatura e pH. Para o derivado de PHB-LBC melhores resultados de atividade hidrolítica foram obtidos a partir da razão suporte lipase 1:2, velocidade do agitador orbital de 250 rpm, à temperatura de 70 °C em pH 8. Para o derivado PHBV-LBC razão suporte lipase 1:4, velocidade do agitador orbital de 150 rpm, à temperatura de 70 °C em pH 8. Para o derivado de ST-DVB-LBC razão suporte lipase 1:1, velocidade do agitador orbital de 200 rpm, à temperatura de 60 °C em pH 8.

A diferença apresentada nas características dos suportes como a hidrofobicidade, porosidade e grupos funcionais, podem ter influenciado no rendimento da imobilização. Portanto foram incluídos aditivos, PEG, TX e GA, durante a imobilização da LBc para contornar essas possíveis causas negativas. Com a adição dos aditivos houve aumento expressivo da atividade hidrolítica para os derivados de PHB-LBc na presença de TX e ST-DVB-LBc na presença de TX/PEG, proporcionando aumento da atividade hidrolítica de ~ 35% e ~75%, respectivamente. Entretanto nenhuma mudança significativa foi apresentada pelo suporte de PHBV com a adição dos aditivos. O aditivo de GA não proporcionou melhorias consideráveis para os derivados estudados neste trabalho.

Análises instrumentais como FTIR, TGA, DSC, MO, MEV e DRX foram realizadas com a finalidade de demonstrar a possível presença da lipase nos suportes e assim avaliar as mudanças ocorridas devido a imobilização. Através dos espectrogramas de FTIR, apresentados pelos derivados de LBc foi possível avaliar as mudanças físico-químicas proporcionadas através da imobilização. Bandas características das lipases de amidas I, II e III nas regiões do espectro entre ~1650 cm⁻¹, ~2800 cm⁻¹ e 1150 cm⁻¹, respectivamente, foram observadas para os derivados de PHB-LBc e PHBV-LBc. Para o derivado de ST-DVB-LBc é possível observar banda referente a amida I na região de ~1150 cm⁻¹. A presença das bandas de amidas para os suportes após a imobilização, podem confirmar a possível presença da lipase nos suportes poliméricos.

As análises térmicas de TGA/DTG e DSC contribuíram para verificar as mudanças térmicas ocorridas devido a imobilização da lipase nos suportes. As curvas de TGA/DTG mostraram que os suportes de PHB, PHBV e ST-DVB proporcionaram maior resistência térmica a lipase, apresentando menor perda de massa. As curvas de DSC revelaram a mudanças ocorridas nas entalpias dos suportes, suporte/lipase e suporte/lipase/aditivo, que aumentaram os valores após a imobilização, indicando a presença de lipase e a necessidade de maior energia para que possa ocorrer transformações.

As análises da morfologia da superfície dos suportes foram realizadas através de MO e MEV. As imagens obtidas pela MO para os derivados de PHB, PHBV e ST-DVB não apresentaram nenhuma mudança em sua morfologia antes e após a imobilização. Quando foram analisadas as imagens dos suportes imersos em solução

alcoólica foi possível observar mudanças na morfologia dos suportes com destaque para o PHB que apresentou mudanças de sua superfície rugosa para lisa, possivelmente devido ao “inchaço” provocado pelo álcool. Essa mudança não foi tão expressiva para os suportes de PHBV e ST-DVB. Mudanças no tamanho dos polímeros puderam ser observadas a partir das imagens de MO.

As imagens formadas por MEV revelaram mudanças na superfície do suportes de PHB e PHBV. Após a imobilização formou-se um filme sobre a superfície do suportes, proporcionando mudanças visuais como a diminuição das cavidades e rugosidade da superfície, quando comparadas as imagens dos suportes antes da imobilização. O derivado de ST-DVB não apresentou nenhuma mudança significativa em sua morfologia a partir das imagens obtidas por MEV. Mudanças no grau de cristalinidade dos suportes foram observados através de difratogramas formados por DRX após a imobilização da LBc. Como a estrutura da lipase apresenta regiões totalmente amorfas, sua presença pode ter contribuído com a diminuição da intensidade dos picos

O modelo para a adsorção física da lipase proposto neste trabalho para LBc, apresentou resultados satisfatórios para os derivados de PHB-LBc e ST-DVB e validados através das análises químicas e instrumentais, podendo assim serem testados na produção de bioprodutos. O suporte de PHBV não apresentou bom desempenho e rendimento para a imobilização da LBc a partir da metodologia proposta para imobilização neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAHÁZI, E.; BOROS, Z.; POPPE, L. Additives enhancing the catalytic properties of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on mixed-function-grafted mesoporous silica gel. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9818–9837, 2014.

ABAHÁZI, E. et al. Covalently immobilized Trp60Cys mutant of ω -transaminase from *Chromobacterium violaceum* for kinetic resolution of racemic amines in batch and continuous-flow modes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 132, p. 270–278, 2018.

ABDELMOEZ, W.; MUSTAFA, A. Oleochemical Industry Future through Biotechnology. **Journal of Oleo Science**, v. 63, n. 6, p. 545–554, 2014.

ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 8–13, 1, 2013.

ADEEL, M. et al. Graphene and graphene oxide: functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1430–1440, 2018.

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

AGARWAL, B. et al. Sustainable Production of Chemicals and Energy Fuel Precursors from Lignocellulosic Fractions. In: **Green Energy and Technology**. [s.l.] Springer Verlag, 2017. p. 7–33.

ALVES, M. D. et al. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1–12, 2017.

AMINI, Zeynab et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 339–353, 2017.

ANDRADE, L. H. et al. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 55–62, 2010.

ARDLEY, H. C.; ROBINSON, P. A. E3 ubiquitin ligases. **Essays in biochemistry**, v. 41, p. 15–30, 2005.

ASMAT, S.; HUSAIN, Q. Exquisite stability and catalytic performance of immobilized lipase on novel fabricated nanocellulose fused polypyrrole/graphene oxide nanocomposite: Characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 331–341, 1, 2018.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Immobilization of lipase on biocompatible co-polymer of polyvinyl alcohol and chitosan for synthesis of laurate compounds in supercritical carbon dioxide using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1224–1236, 2015.

BARBE, S. et al. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred

from molecular dynamics simulations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 77, n. 3, p. 509–523, 15, 2009.

BARBOSA, O. et al. The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 766–774, 2012a.

BARBOSA, O. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 2012b.

BASALE, R. Selective catalytic hydrogenation of α , β -unsaturated aldehyde to unsaturated alcohol: investigation of the role of the promoter. **Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven**, p. 157, 2013.

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

BERAN, M. et al. Immobilisation of endoinulinase on polyhydroxybutyrate microfibers. **Czech Journal of Food Sciences**, 2016.

BARON, A. M. et al. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v. 117, p. 458–462, 30, 2014.

BEPPU, M. M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, n. 1-2, p. 126–130, 2007.

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, 2, 2006.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 388, p. 1–23, 2019.

BILAL, M. et al. Horseradish peroxidase immobilization by copolymerization into cross-linked polyacrylamide gel and its dye degradation and detoxification potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 983–990, 2018.

BINHAYEEDING, N. et al. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, 2020.

BLANCO, R. M. et al. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 83–93, 3, 2004.

BLANCO, R. M. et al. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 1-2, p. 13–20, 2007.

BOROS, Z. et al. Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1039–1047, 1, 2013.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology**

Letters, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 10, 2009.

BRITO, M. J. P. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CARVÃO ATIVADO PRODUZIDO A PARTIR DO CAROÇO DE CAJÁ. Tese (Doutorado). **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**. Engenharia e Ciência dos Alimentos. Itapetinga - BA, 2016.

CABRERA-PADILLA, R. Y. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 289–298, 26, 2012.

CARVALHO, N. B. et al. Lipase Immobilization on Silica Xerogel Treated with Protic Ionic Liquid and its Application in Biodiesel Production from Different Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p 1829, n. 7, 2018.

CAMPELO, N. M.; MACHADO, F. Reciclagem de Poli (estireno-divinilbenzeno) via Processo de Polimerização em Massa-Suspensão. **Polímeros**, v. 23, n. 2, p. 212-222, 2013.

CAN, K.; OZMEN, M.; ERSOZ, M. Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 154-159, 2009.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. Biophysical Chemistry: Part I. San Francisco: W. H. **Freeman and Company**, 1980.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2014.

CAO, L.; LANGEN, L. VAN; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387–394, 1 2003.

CAO, W. DNA ligases: Structure, function and mechanism. **Current Organic Chemistry**, v. 6, p 827-839, 2002.

CAPECCHI, E. et al. Functionalized tyrosinase-lignin nanoparticles as sustainable catalysts for the oxidation of phenols. **Nanomaterials**, v. 8, n. 6, p. 438, 2018.

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, 2017.

CIB-Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **Guia do combustível renovável. Agroenergia para um mundo sustentável**. Disponível em <http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/guia_combustivel_renovavel.pdf>. Acesso em 20 de setembro de 2019.

CIPOLATTI, E. P. et al. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 163-169, 2015.

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

CHAUDHARY, V.; SHARMA, S. Effect of various synthesis parameters on styrene–divinylbenzene copolymer properties. **Journal of Porous Materials**, v. 26, n. 6, p. 1559-1571, 2019

CHEN, N. et al. Activation and stabilization of lipase by grafting copolymer of hydrophobic and zwitterionic monomers onto the enzyme. **Biochemical Engineering Journal**, p. 107557, 2020.

CHENG, C. et al. Elucidation of lid open and orientation of lipase activated in interfacial activation by amphiphilic environment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1211–1217, 1, 2018.

CHERNOZEM, R. V. et al. Piezoelectric 3-D fibrous poly (3-hydroxybutyrate)-based scaffolds ultrasound-mineralized with calcium carbonate for bone tissue engineering: inorganic phase formation, osteoblast cell adhesion, and proliferation. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 21, p. 19522-19533, 2019.

CHOI, G. G. et. al. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes sp.* MT-16. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 346-352, 2004.

CHU, S.; MAJUMDAR, A.. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 294-303, 2012.

COLTHUP, N. B. Spectra-structure correlations in the infra-red region. **JOSA**, v. 40, n. 6, p. 397-400, 1950.

DA SILVA, L. F. et al. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates in Brazil for biodegradable polymers. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732–1743, 2007.

DAIHA, G. K. et al. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. **PloS One**, v. 10, n. 6, p. e0131624, 2015.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. **São Paulo: Blucher**, p. 11-35, 2011

DAVANKOV, V. A. Analytical chiral separation methods (IUPAC Recommendations 1997). **Pure and applied chemistry**, v. 69, n. 7, p. 1469-1474, 1997.

DE OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; DE CASTRO, H. F. Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene–divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, n. 1, p. 63–71, 2000.

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, 2018.

DE SOUZA, R. L. et al. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 3, p. 141–150, 2013.

DE SOUZA, R. O. M. A. et al. Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 16, p. 6157-6162, 2009.

DHAKE, Kishor P. et al. Enzymatic activity studies of *Pseudomonas cepacia* lipase adsorbed onto copolymer supports containing β -cyclodextrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 105-112, 2013.

DI COSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, 2013.

DIAS, G. S. et al. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on layered double hydroxide of Zn/Al-Cl for kinetic resolution of rac-1-phenylethanol. **Enzyme and microbial technology**, v. 130, p. 109-365, 2019.

DIAZ, J. F.; BALKUS JR, K. J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 2, n. 2-3, p. 115-126, 1996.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2–3, p. 220–225, 2009.

DIZGE, N. et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 1983-1991, 2009.

DROUT, R. J.; ROBISON, L.; FARHA, O. K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 381, p. 151-160, 2019.

ERDEMIR, S. et al. Effect of the glutaraldehyde derivatives of Calix[n]arene as cross-linker reagents on lipase immobilization. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, n. 3–4, p. 273–282, 2009.

ELGHARBAWY, A. A.; MONIRUZZAMAN, M.; GOTO, Masahiro. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids: Part II. **Biochemical Engineering Journal**, v. 154, p. 107426, 2020.

ERTL, G. et al. Elementary steps in heterogeneous catalysis: The basis for environmental chemistry. **Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology**, v. 22, n. 1-2, p. 11-41, 2017.

FABRA, M. J. et al. Matryoshka enzyme encapsulation: Development of zymoactive hydrogel particles with efficient lactose hydrolysis capability. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 171–177, 2019.

FERNANDES, I. A. et al. Nanoparticles of poly(hydroxybutyrate- co - hydroxyvalerate) as support for the immobilization of *Candida antarctica* lipase (Fraction B). **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 331–336, 2014.

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

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 18-25, 2017.

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. **Analytical biochemistry**, v. 259, n. 1, p. 136-141, 1998.

FORATO, L. A. et al. A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Ethanol pretreatment effect and particle diameter issues on the adsorption of *Candida rugosa* lipase onto polypropylene powder. **Applied Surface Science**, v. 238, n. 1–4, p. 86–90, 2004.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L.. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 69–77, 2005.

FREITAS, D.R.J.; JUNIOR, I.S.V; MASUDA, A.O.I.. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 99–104, 2008.

GAO, S. et al. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 996–999, 2009.

GALLEZOT, P.; RICHARD, D. Selective hydrogenation of α , β -unsaturated aldehydes. **Catalysis Reviews**, v. 40, n. 1–2, p. 81–126, 1998

GHORABI, S. et al. Effects of three surfactant types of anionic, cationic and non-ionic on tensile properties and fracture surface morphology of epoxy/MWCNT nanocomposites. **Iranian Polymer Journal**, v. 21, n. 2, p. 121–130, 2012.

GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 710–718, 2006.

GROSS, R. A.; GANESH, M.; LU, W. Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations. *Trends in biotechnology*, v. 28, n. 8, p. 435–443, 2010.

GRUBHOFFER, N.; SCHLEITH, Lotte. Modifizierte ionenaustauscher als spezifische adsorbentien. **Naturwissenschaften**, v. 40, n. 19, p. 508–508, 1953.

GULDHE, A. et al. Biocatalytic conversion of lipids from microalgae *Scenedesmus obliquus* to biodiesel using *Pseudomonas fluorescens* lipase. **Fuel**, v. 147, p. 117–124, 2015.

GUNARATNE, L. M. W. K.; SHANKS, R. A. Multiple melting behaviour of poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 12, p. 2980–2988, 2005.

GUNDA, N. S. K. et al. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. **Applied Surface Science**, v. 305, p. 522–530, 2014.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712–725, 2015.

HARA, P.; HANEFELD, U. KANERVA, L. T. Sol–gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, n. 2–4, p. 80–86, 2008.

HARRIS, J. M. (Ed.). Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. **Springer Science & Business Media**, 2013.

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

HEIDER, Johann. A new family of CoA-transferases. **FEBS letters**, v. 509, n. 3, p. 345–349, 2001.

HENRICH, E. et al. Lipid requirements for the enzymatic activity of MraY translocases and in vitro reconstitution of the lipid II synthesis pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 5, p. 2535–2546, 2016.

HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 1, p. 72–78, 2011.

HOFFMANN, C. et al. Surface modification of polysulfone membranes applied for a membrane reactor with immobilized alcohol dehydrogenase. **Materials Today Communications**, v. 14, p. 160–168, 2018.

HRYDZIUSZKO, Z. et al. *Burkholderia cepacia* lipase immobilization for hydrolytic reactions and the kinetic resolution of the non-equimolar mixtures of isomeric alcohols. **Bioorganic Chemistry**, 2019.

HUGOUIVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; CONDEMINE, G.; SHEVCHIK, V. E. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 5, p. 427–440, 2014.

HUNTER-SELLARS, Elwin et al. Adsorption of volatile organic compounds by industrial porous materials: Impact of relative humidity. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 298, p. 110090, 2020.

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

ILAIYARAJA, P. et al. Adsorption of uranium from aqueous solution by PAMAM dendron functionalized styrene divinylbenzene. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250, p. 155–166, 2013.

JANG, J.; KIM, B.. Studies of crosslinked styrene–alkyl acrylate copolymers for oil absorbency application. I. Synthesis and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 77, n. 4, p. 903–913, 2000.

JANKOWSKA, D. A. et al. *Arxula adenivorans* xanthine oxidoreductase and its application in the production of food with low purine content. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 796–807, 2013.

KAETHONG, Wiphum et al. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1525–1530, 2005.

KAWANO, Y.; LAURE, C. J.; GIGLIO, J. R. Laser Raman study on crotamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 705, n. 1, p. 20–25, 1982.

KONG, L. et al. Absorption, fluorescence and resonance Rayleigh scattering spectra of hydrophobic hydrogen bonding of eosin Y/Triton X-100 nanoparticles and their analytical applications. **Science China Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 2363-2372, 2010.

KOSEOGLU-IMER, D. Y.; KESKINLER, B. Immobilization of Acidithiobacillus ferrooxidans on sulfonated microporous poly (styrene-divinylbenzene) copolymer with granulated activated carbon and its use in bio-oxidation of ferrous iron. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 53-58, 2013.

KUMAR, A. et al. Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications. **Biological Procedures Online** BioMed Central Ltd., 2016.

LAI, M. et al. The morphology and thermal properties of multi-walled carbon nanotube and poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) composite. **Polymer international**, v. 53, n. 10, p. 1479-1484, 2004.

LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and microbial technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.

LANGLOIS, D.P.; DALE, J.K. Sirup and method of making the same. 1940; **United States patent US 2201609**, 1940.

LEE, D. G. et al. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 62-66, 2009.

LEMSTRA, P. J.; KOOISTRA, T.; CHALLA, G. Melting behavior of isotactic polystyrene. **Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics**, v. 10, n. 5, p. 823-833, 1972.

LI, F. et al. A genetically-encoded synthetic self-assembled multienzyme complex of lipase and P450 fatty acid decarboxylase for efficient bioproduction of fatty alkenes. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 451-457, 2019.

LI, S. D.; YU, P. H.; CHEUNG, M. K. Thermogravimetric analysis of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 80, n. 12, p. 2237-2244, 2001.

LI, K. et al. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 351, p. 258-268, 2018.

LI, K. et al. *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16473, 2017.

LI, P. et al. Encapsulation of a nerve agent detoxifying enzyme by a mesoporous zirconium metal-organic framework engenders thermal and long-term stability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 26, p. 8052-8055, 2016.

LI, Y. et al. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 182-189, 2010.

- LI, Y. et al. 3-D magnetic graphene oxide-magnetite poly (vinyl alcohol) nanocomposite substrates for immobilizing enzyme. **Polymer**, v. 149, p. 13-22, 2018.
- LISBOA, M. C. et al. New perspectives on the modification of silica aerogel particles with ionic liquid used in lipase immobilization with platform in ethyl esters production. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 157-165, 2018.
- LIU, T. et al. Improving catalytic performance of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on macroporous resin NKA. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 1-2, p. 45-50, 2011.
- LIU, J. et al. Improved catalytic performance of lipase accommodated in the mesoporous silicas with polymer-modified microenvironment. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9788-9796, 2012.
- LIU, W; GUO, R. Effects of Triton X-100 Nanoaggregates on Dimerization and Antioxidant Activity of Morin. **Molecular Pharmaceutics**. 5 (4), 588-597, 2008.
- LOPES, D.B. et al. Lipase And Esterase-To What Extent Can This Classification Be Applied Accurately? **Ciências Tecnologia dos Alimentos**, Campinas – SP, 2011.
- LÓPEZ, D. E. et al. Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 295, n. 2, p. 97-105, 2005.
- MACARIO, A. et al. Pure silica nanoparticles for liposome/lipase system encapsulation: Application in biodiesel production. **Catalysis Today**, v. 204, p. 148-155, 2013.
- MACHADO, A. et al. Compósitos biodegradáveis a base de polihidroxibutirato-hidroxivalerato (PHBV) reforçados com resíduos do beneficiamento do café. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 15, n. 3, p. 400-404, 2010.
- MANSUR, H. S. et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 539-548, 2008.
- MARKITON, M. et al. Highly active nanobiocatalyst from lipase noncovalently immobilized on multiwalled carbon nanotubes for Baeyer-Villiger synthesis of lactones. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1685-1691, 2017.
- MARTINS, A. B. et al. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 417-422, 2013.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007.
- MATHPATI, A. C.; BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Kinetic modeling and docking study of immobilized lipase catalyzed synthesis of furfuryl acetate. **Enzyme and microbial technology**, v. 84, p. 1-10, 2016.
- MENDES, A. A. et al. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503-511, 2012.
- MENDES, A. A. et al. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

- MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, p. 213-234, 2011.
- MENEGATTI, T.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P. Copolymeric Hydrogel-Based Immobilization of Yeast Cells for Continuous Biotransformation of Fumaric Acid in a Microreactor. **Micromachines**, v. 10, n. 12, p. 867, 2019.
- MIJONE, P. D. et al. Coating and incorporation of iron oxides into a magnetic-polymer composite to be used as lipase support for ester syntheses. **Renewable Energy**, v. 149, p. 1167-1173, 2020.
- MILETIĆ, N. et al. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins-Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 196–201, 2009.
- MILLER-CHOU, B. A.; KOENIG, J. L. A review of polymer dissolution. **Progress in Polymer Science**, v. 28, n. 8, p. 1223-1270, 2003.
- MIN, K. et al. A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase. **Bioresource technology**, v. 289, p. 121730, 2019.
- MOHANRASU, K. et al. Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. **Fuel**, v. 271, p. 117-522, 2020
- MOREIRA, W. C. et al. Alternative method to improve the ethyl valerate yield using an immobilised *Burkholderia cepacia* lipase. **Journal of microencapsulation**, v. 36, n. 4, p. 327-337, 2019.
- MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1-9, 2009.
- MWASILU, F. et al. Electric vehicles and smart grid interaction: A review on vehicle to grid and renewable energy sources integration. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 34, p. 501-516, 2014.
- NARA, S. J. et al. Influence of ionic liquids on the rates and regioselectivity of lipase-mediated biotransformations on 3, 4, 6-tri-O-acetyl-D-glucal. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, n. 1, p. 39-43, 2004.
- NAKAGAWA, H.; TSUGE, S. Characterization of styrene-divinylbenzene copolymers by high-resolution pyrolysis-gas chromatography. **Macromolecules**, v. 18, n. 10, p. 2068-2072, 1985.
- NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. **Macmillan**, 2008.
- NUR, H. Heterogeneous Chemocatalysis: Catalysis by Chemical Design. **Ibnu Sina Institute for Fundamental Science Studies Universiti Teknologi Malaysia**, Johor Bahru, 2006.
- OLIVEIRA, B. H. et al. Overproduction and properties of lipase by a wild strain of *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 using chicken fat. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 865–877, 2015.
- OLIVEIRA, L. G. DE; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742–756, 2009.

OTTEN, H. et al. Structure and mechanism of rhamnogalacturonan lyases. In: ACTA CRYSTALLOGRAPHICA A-FOUNDATION AND ADVANCES. ENGLAND: INT UNION CRYSTALLOGRAPHY, p. 284, 2008

OZMEN, E. Y.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1–4, p. 109–114, 2009.

OZMEN, E. Y.; YILMAZ, M. Pretreatment of *Candida rugosa* lipase with soybean oil before immobilization on β -cyclodextrin-based polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, n. 1, p. 58–62, 2009.

OZYILMAZ, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 231–236, 1 abr. 2009.

PADILHA, G. S. et al. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 7–19, 2012.

PADILHA, G. S. et al. Multi-walled carbon nanotubes used as support for lipase from *Burkholderia cepacia*. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 2, p. 1021–1029, 2018.

PADILHA, G. S.; OSÓRIO, W. R. Economic method for extraction/purification of a *Burkholderia cepacia* lipase with potential biotechnology application. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 1-19, 2019.

PAHUJANI, S. et al. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: enzyme characteristics and stability. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2566-2570, 2008.

PANDE, S.V. et al. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency with severe hypoglycemia and auriculo ventricular block. Translocase assay in permeabilized fibroblasts. The **Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 3, p. 1247-1252, 1993.

PANDIAN, S. R. K. et al. Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei* SRKP2: A green chemistry approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 266–273, 2009.

PARAMJEET, S.; MANASA, P.; KORRAPATI, N.. Biofuels: Production of fungal-mediated ligninolytic enzymes and the modes of bioprocesses utilizing agro-based residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 57-71, 2018.

PAVIA, D. L. et al. Espectroscopia no infravermelho. Introdução à espectroscopia, v. 4, p. 64-65, 2010.

PENCREACH, G.; BARATTI, J. C. Properties of free and immobilised lipase from *Burkholderia cepacia* in organic media. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 276-280, 1999.

PEREIRA, T. M. C. et al. Efeito dos solventes orgânicos sobre o comportamento físico-químico do polietileno de alta densidade (PEAD) e polipropileno (PP). **Polimeros**, v. 24, n. 3, p. 300–306, 2014.

PERSSON, M.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum. **Biotechnology letters**, v. 22, n. 19, p. 1571-1575, 2000.

PINTO, M. C. C. et al. Effect of hydrophobicity degree of polymer particles on lipase immobilization and on biocatalyst performance. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-11, 2020.

PERNA, Rafael F. et al. Effects of Triton X-100 and PEG on the catalytic properties and thermal stability of lipase from *Candida rugosa* free and immobilized on glyoxyl-agarose. **The Open Biochemistry Journal**, v. 11, p. 66, 2017.

PUGAZHENDHI, A. et al. A review on chemical mechanism of microalgae flocculation via polymers. **Biotechnology Reports**, v. 21, p.302, 2019.

PUNEKAR, N. S.; PUNEKAR, N. S. On Enzyme Nomenclature and Classification. **Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**. p. 33–41, 2018.

QUAYSON, E. et al. Valorization of Activated Carbon as a Reusable Matrix for the Immobilization of *Aspergillus oryzae* Whole-Cells Expressing *Fusarium heterosporum* Lipase toward Biodiesel Synthesis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 5, p. 5010–5017, 2019.

QIU, J. et al. Efficient Ionic-Liquid-Promoted Chemical Fixation of CO₂ into α -Alkylidene Cyclic Carbonates. **ChemSusChem**, v. 10, n. 6, p. 1120-1127, 2017.

RAGHAVENDRA, T. et al. Robust nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B–Multiwalled carbon nanotubes: characterization and application for multiple usages in non-aqueous biocatalysis. **Bioresource technology**, v. 140, p. 103-110, 2013.

RAMOS, E. Z. et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, 1 ago. 2015.

RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 187–192, 2001.

REHM, F. B. H; CHEN, S.; REHM, B. H. A. Bioengineering toward direct production of immobilized enzymes: a paradigm shift in biocatalyst design. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 6-11, 2018.

REHMAN, H. U. et al. Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 622–626, 15, 2014.

REHMAN, S. et al. Improved catalytic properties of *Penicillium notatum* lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films. **International journal of biological macromolecules**, v. 97, p. 279-286, 2017.

REHMAN, S. et al. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Penicillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 1161-1169, 2016.

RESENDE, R. R. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. [s.l.] Editora

Blucher, 2017. p. 529–568.

RIOS, N. S. et al. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018.

RIZZOLIO, F.; TUCCINARDI, T. (2019). Peptidyl-Prolyl Isomerases in Human Pathologies. **Frontiers in pharmacology**, 10, 794.

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, 2019.

ROBERTS, M. W. Birth of the catalytic concept (1800-1900). **Catalysis Letters**, v. 67, n. 1, p. 1-4, 2000.

ROUXHET, Laurence et al. Adsorption of albumin, collagen, and fibronectin on the surface of poly (hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)(PHB/HV) and of poly (ϵ -caprolactone)(PCL) films modified by an alkaline hydrolysis and of poly (ethylene terephthalate)(PET) track-etched membranes. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 9, n. 12, p. 1279-1304, 1998.

SASSO, F. et al. *Burkholderia cepacia* lipase is a promising biocatalyst for biofuel production. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 7, p. 954–960, 2016.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SALUM, T. F. C. et al. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2008.

SÁNCHEZ, M. et al. Jojoba oil: a state of the art review and future prospects. **Energy Conversion and Management**, v. 129, p. 293-304, 2016.

SCHIFFMAN, J. D.; SCHAUER, C. L. Cross-linking chitosan nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 2, p. 594-601, 2007.

SEH, Z. W. et al. Combining theory and experiment in electrocatalysis: Insights into materials design. **Science**, v. 355, n. 6321, 2017.

SENHORINI, G. A. et al. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: Preparation and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1121–1126, 2012.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SHELDON, Roger A.; WOODLEY, John M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry. **Chemical reviews**, v. 118, n. 2, p. 801-838, 2018.

SHUAI, W. et al. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 496-508, 2017.

SILVA, N. C. A. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139–149, 2014.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SIMON, P. et al. Cellulase immobilization on poly (methyl methacrylate) nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 649-658, 2018.

SOARES, C. M. F. et al. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in presence of polyethylene glycol. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. p. 863-874, 2002.

SOUZA, R. L. et al. Use of polyethylene glycol in the process of sol-gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 117, n. 1, p. 301-306, 2014.

SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, Vol. 26, No. 6, 832-838, 2003.

SOUZA, L. T. DE A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. Editora Blucher. p. 529-568, 2017.

SPERLING, L. H. Introduction to Physical Polymer Science. 4th Edition. **John Wiley & Sons**, Inc. 2006.

SYCHEV, S. V.; BARSUKOV, L. I.; IVANOV, V. T. Conformation of gramicidin A in Triton X-100 micelles from CD and FTIR data: a clean example of antiparallel double β 5. 6 helix formation. **Journal of peptide science**, v. 19, n. 7, p. 452-458, 2013.

TANABE, K.; HÖLDERICH, W. F. Industrial application of solid acid-base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 181, n. 2, p. 399-434, 1999.

THAKAR, A.; MADAMWAR, D. Enhanced ethyl butyrate production by surfactant coated lipase immobilized on silica. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3263-3266, 2005.

THANGARA J. B. et al. Effect of silica coating on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4694-4706, 2019.

THIRÉ, R. M. S. M.; ARRUDA, L. C.; BARRETO, L. S.. Morphology and thermal properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/attapulgitite nanocomposites. **Materials Research**, v. 14, n. 3, p. 340-344, 2011.

TURNER, Nigel A.; VULFSON, Evgeny N. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 1-2, p. 108-113, 2000.

TIPTON, K.; MCDONALD, A. **A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification**. 2018.

TOMAR, S.; AGGARWAL, M. Structure and function of alphavirus proteases. In: Viral Proteases and Their Inhibitors. **Academic Press**, 2017. p. 105-135.

TRAN, D. N.; BALKUS, K. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. **ACS Catal**, v. 1, p. 956-968, 2011.

TRANTAFYLLOU, A. Ö. et al. How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media?. **Biotechnology and bioengineering**, v. 54, n. 1, p. 67-76, 1997.

- VAGHARI, H. et al. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 2, p. 223-233, 2016.
- VELIČIĆ, Z. et al. The optimization of glycidyl methacrylate based terpolymer monolith synthesis: an effective *Candida rugosa* lipase immobilization support. **Journal of Polymer Research**, v. 27, p. 127, 2020.
- VIANA, R.M.; PRADO, M.A.F.; ALVES, R.J. Synthesis and modifications of heterocyclic derivatives of D-arabinose: potential inhibitors of glucose-6-phosphate isomerase and glucosamine-6-phosphate synthase. **Química Nova**, 1710-1713, 2008.
- VILAS BÔAS, R. N. et al. Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 61–68, 2018.
- WANG, Y.; HSIEH, Y. LO. Enzyme immobilization to ultra-fine cellulose fibers via amphiphilic polyethylene glycol spacers. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 17, p. 4289–4299, 2004.
- WON, S. H. et al. Predicting the global combustion behaviors of petroleum-derived and alternative jet fuels by simple fuel property measurements. **Fuel**, v. 168, p. 34–46, 2016.
- YANG, D.; OLSTAD, H. E.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. Increased thermal stability of a glucose oxidase biosensor under high hydrostatic pressure. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 134, p. 109-486, 2020.
- YANG, H.; ZHANG, W. Surfactant imprinting hyperactivated immobilized lipase as efficient biocatalyst for biodiesel production from waste cooking oil. **Catalysts**, v. 9, n. 11, p. 914, 2019.
- YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3–4, p. 91–96, 2007.
- YANG, S et al. Thermal analysis of an acrylonitrile–butadiene–styrene/SWNT composite. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, n. 3, p. 383-388, 2004.
- YANG, T. H. et al. In situ immobilized lipase on the surface of intracellular polyhydroxybutyrate granules: preparation, characterization, and its promising use for the synthesis of fatty acid alkyl esters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 7, p. 1553–1564, 2015.
- YILDIRIM, A.; MUDABER, S.; ÖZTÜRK, S.. Improved Sustainable Ionic Liquid Catalyzed Production of Symmetrical and Non-Symmetrical Biological Wax Monoesters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 2, p. 180-303, 2019.
- YUNOS, M. Z. et al. Studies on fouling by natural organic matter (NOM) on polysulfone membranes: Effect of polyethylene glycol (PEG). **Desalination**, v. 333, n. 1, p. 36-44, 2014.
- XIE, W.; ZANG, X. Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- γ -Fe₂O₃ nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil. **Food Chemistry**, v. 227, p. 397-403, 2017.

XU, L. et al. Internal quality of coated eggs with soy protein isolate and montmorillonite: Effects of storage conditions. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 8, p. 1921-1934, 2017.

ZAAK, H. et al. Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 117-123, 2017.

ZHANG, J. et al. Synthesis of organized hydroxyapatite (HA) using triton X-100. **Ceramics International**, v. 36, n. 8, p. 2441-2447, 2010.

ZHANG, Y.; HE, S.; SIMPSON, B. K. Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current opinion in food science**, v. 19, p. 30-35, 2018.

ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. **AcS catalysis**, v. 5, n. 8, p. 4503-4513, 2015.

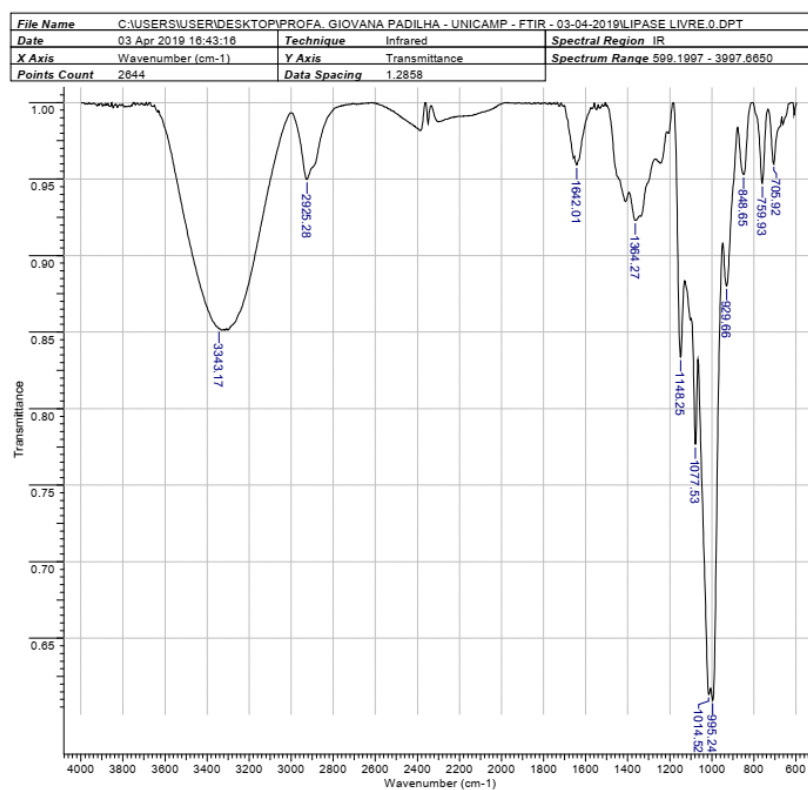
ZHANG, P. et al. Preparation and properties of multi-walled carbon nanotubes and eggshell dual-modified polycaprolactone composite scaffold. **Journal of Polymer Engineering**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2019.

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, 2015.

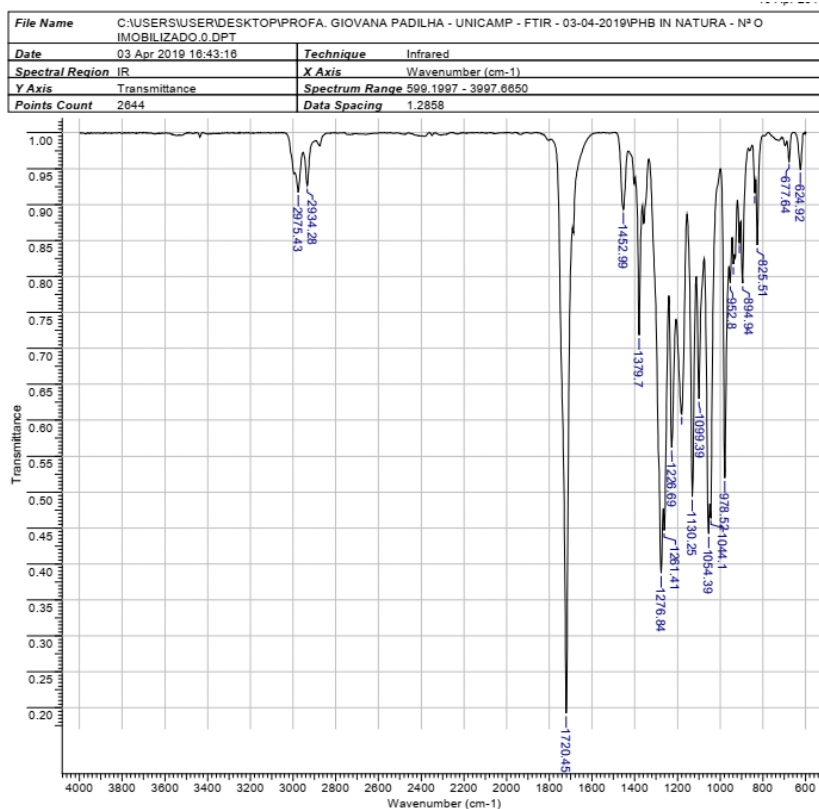
ZHONG, L. et al. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

APÊNDICES A: Espectrogramas

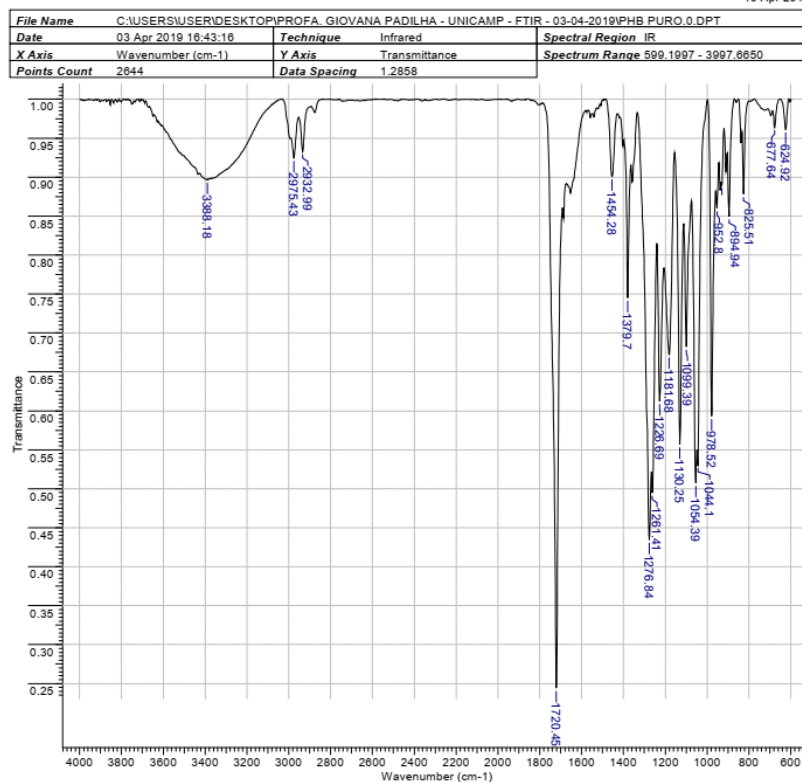
Espectrograma da lipase livre



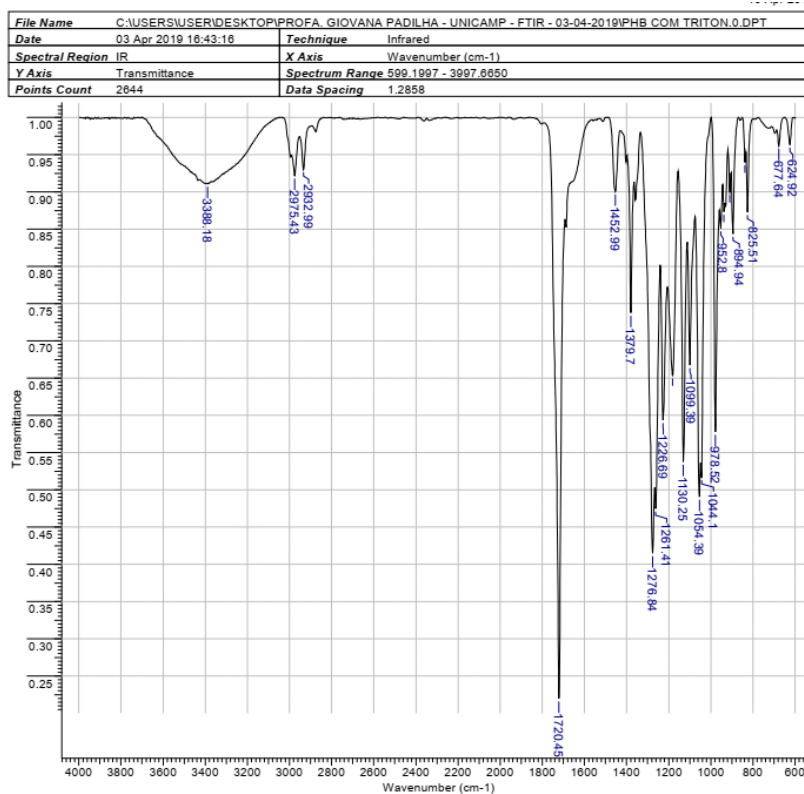
Espectrograma do PHB



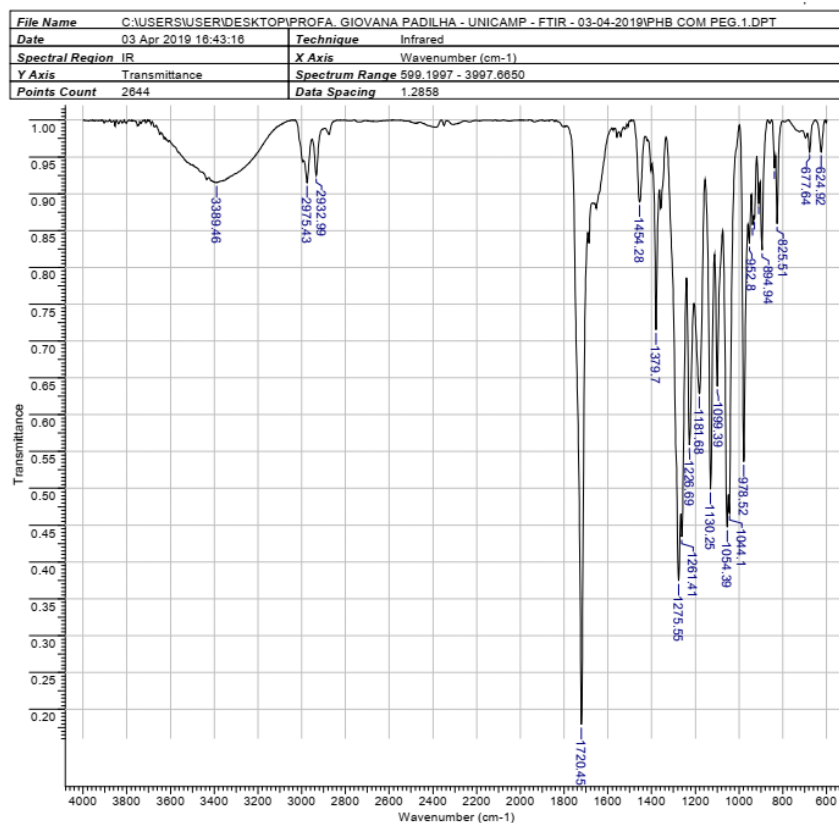
Espectrograma do PHB-LBc



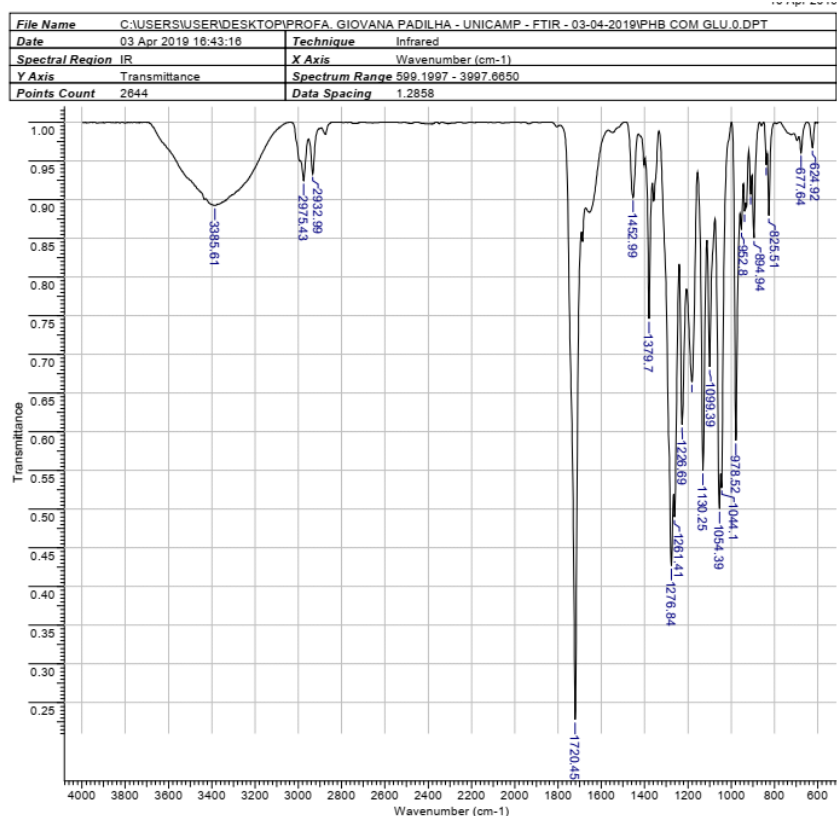
Espectrograma do PHB-LBc-TX



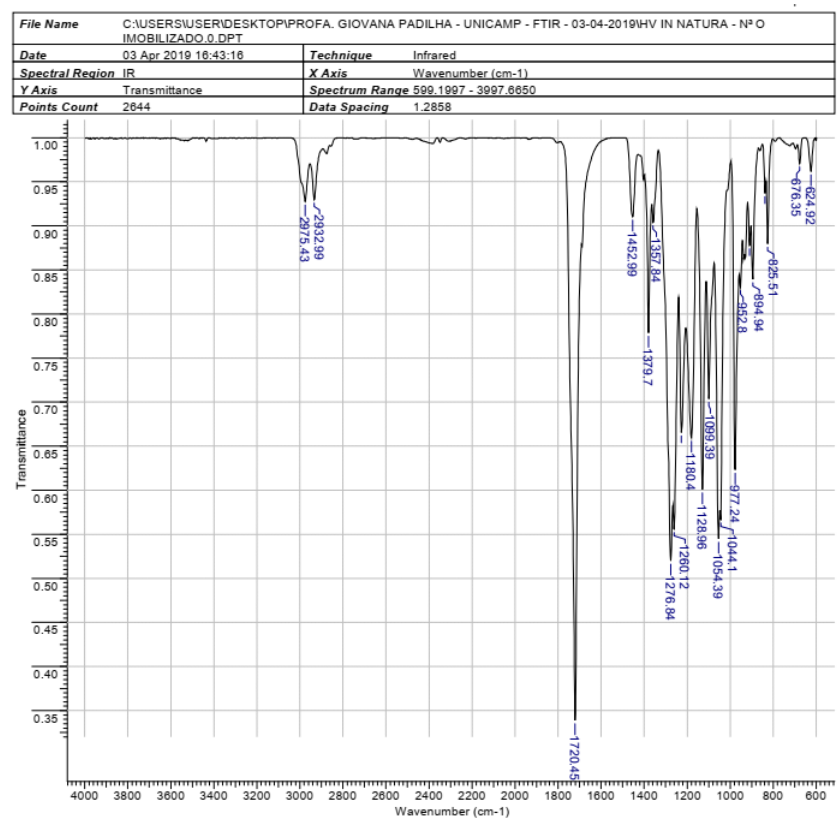
Espectrograma do PHB-LBc-PEG



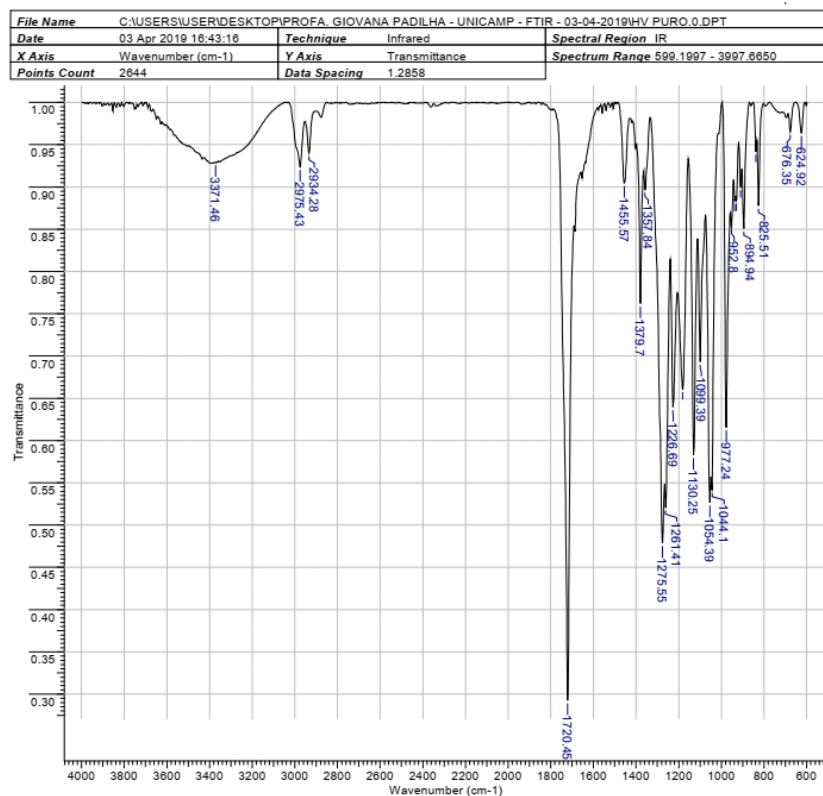
Espectrograma do PHB-LBc-GA



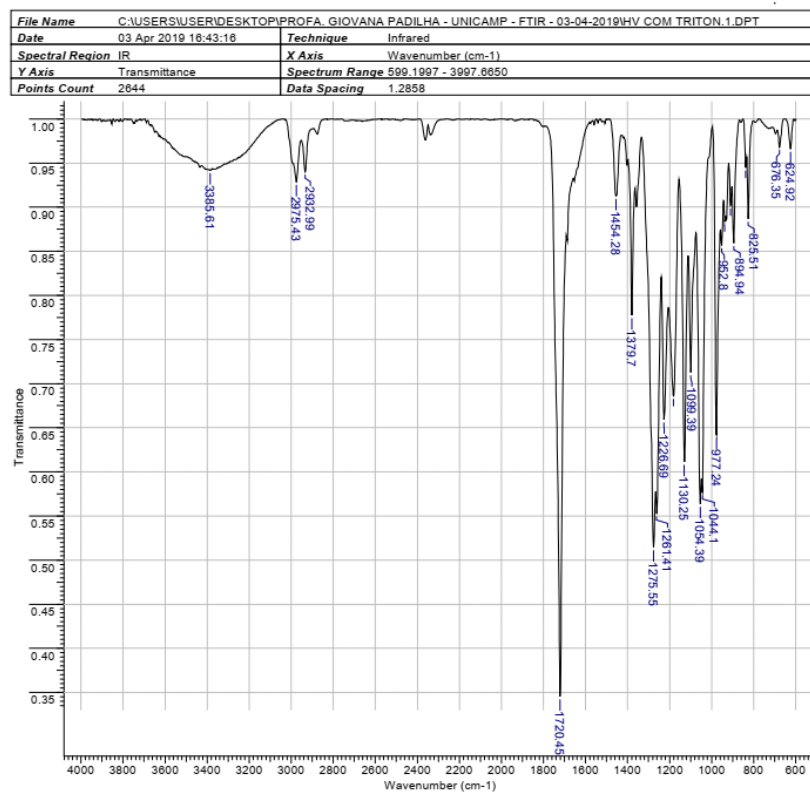
Espectrograma do PHBV



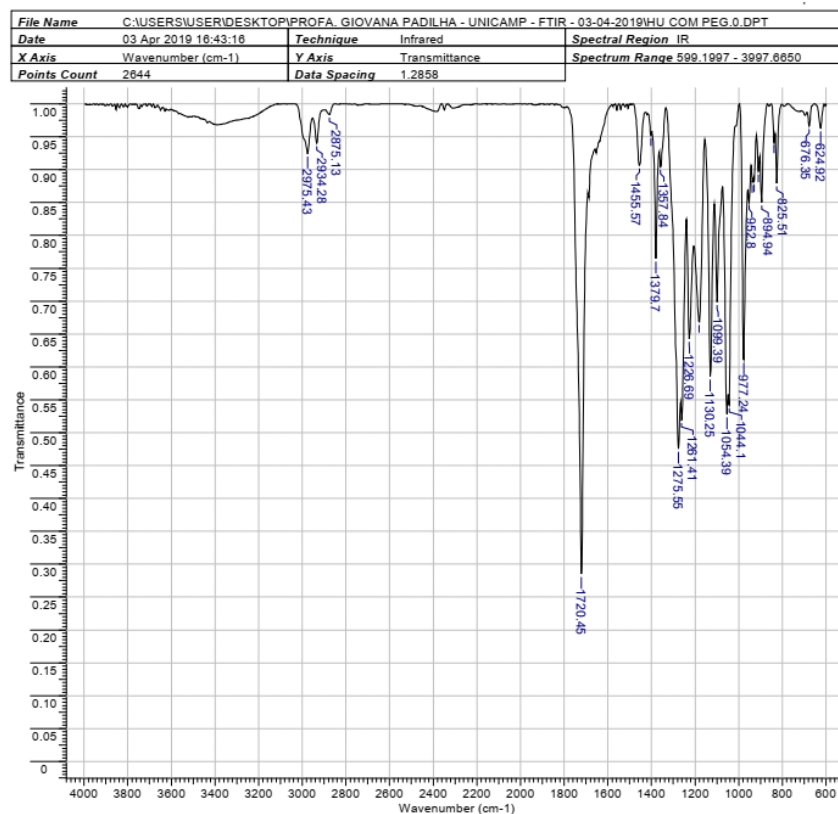
Espectrograma do PHBV-LBc



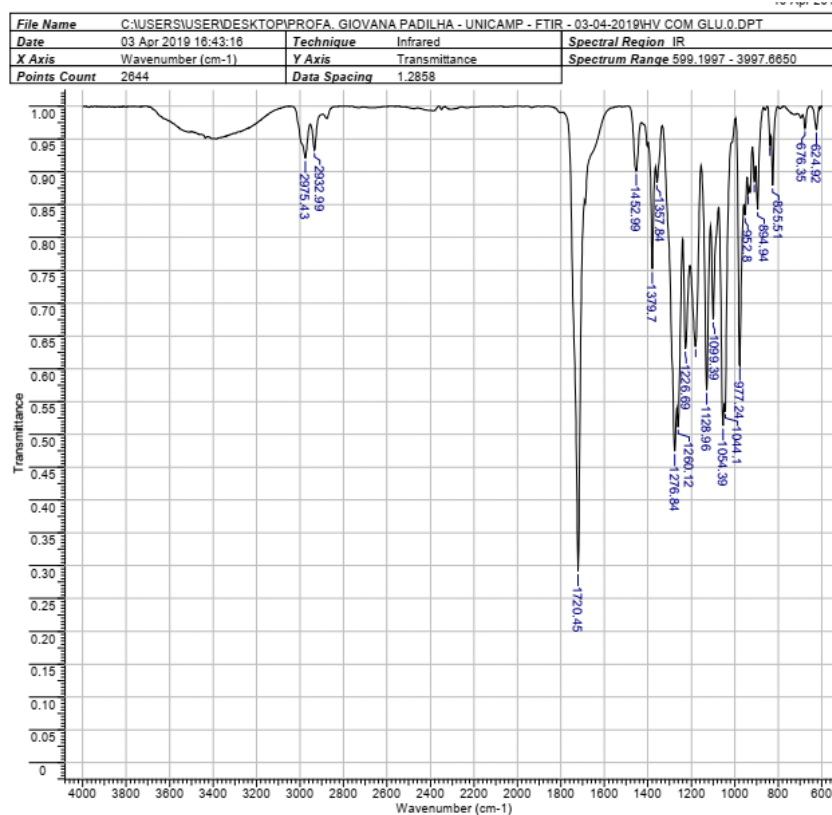
Espectrograma do PHBV-LBc-TX



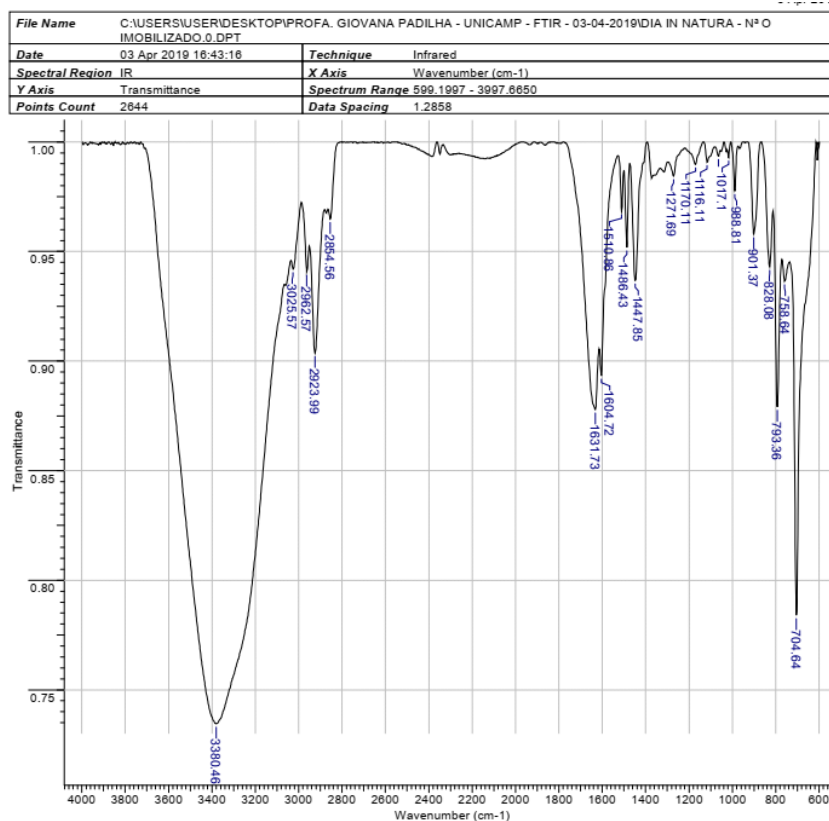
Espectrograma PHBV-LBc-PEG



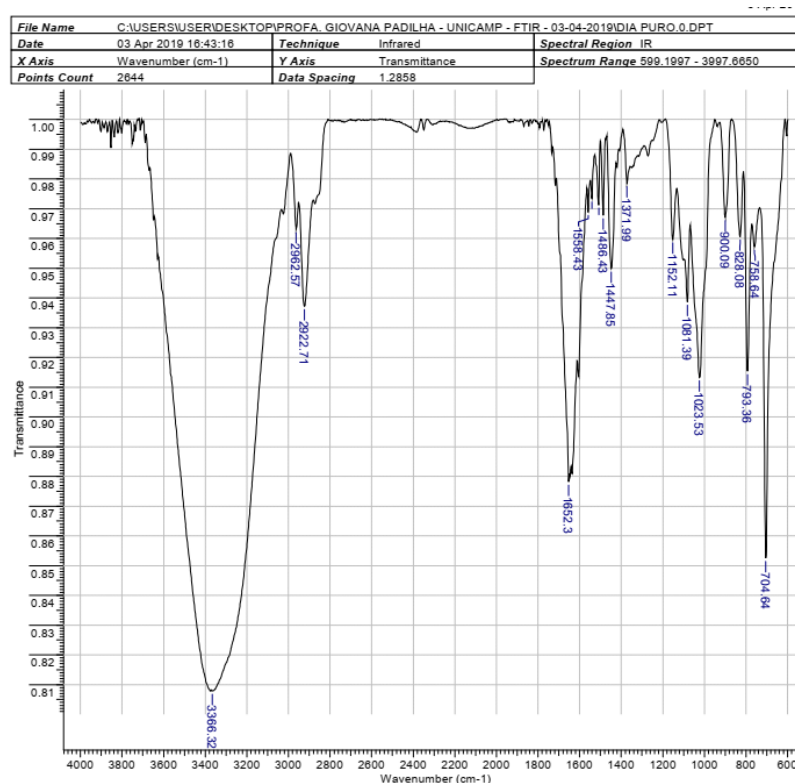
Espectrograma do PHBV-LBc-GA



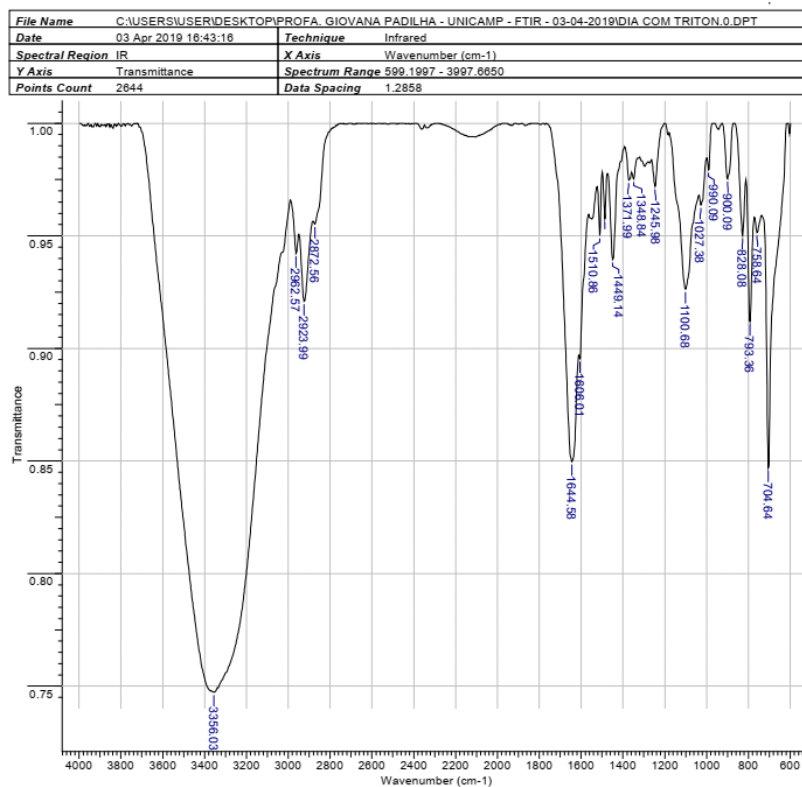
Espectrograma do ST-DVB



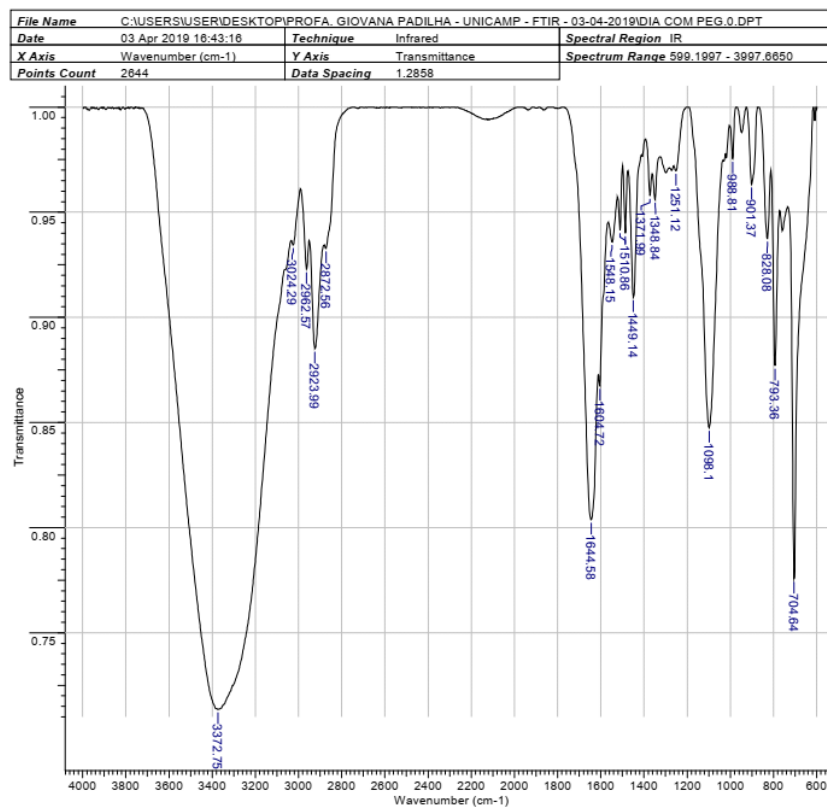
Espectrograma do ST-DVB-LBc



Espectrograma do ST-DVB-LBc-TX



Espectrograma do ST-DVB-LBc-PEG



Espectrograma do ST-DVB-LBc-GA

