

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
LICENCIATURA EM QUÍMICA**

RICARDO DE SOUSA RODRIGUES

SELEÇÃO DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**APUCARANA
2020**

RICARDO DE SOUSA RODRIGUES

SELEÇÃO DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao curso superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Machado Baron

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Valéria Marta Gomes do Nascimento (UNESP- Assis)

APUCARANA

2020



Ministério da Educação
**Universidade Tecnológica Federal do
Paraná**
Câmpus Apucarana
COLIQ – Coordenação do Curso Superior de
Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO
SELEÇÃO DE SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

por

Ricardo de Sousa Rodrigues

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado aos 27 dias do mês de agosto do ano de 2020, às 16 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado em Química, linha de pesquisa Química Orgânica, do Curso Superior de Licenciatura em Química da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados.

Profa. Dra. Alessandra Machado Baron
ORIENTADOR

Prof. Dr. Alesandro Bail
EXAMINADOR

Profa. Dra. Patrícia Salomão Garcia
EXAMINADORA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me dar forças e não me deixar desistir nos momentos em que as dificuldades abalaram minha determinação.

Em segundo lugar agradecer à pessoa que tornou a conclusão deste trabalho possível, à minha orientadora e mãe científica Professora Dra. Alessandra Machado Baron.

Gostaria de agradecer a meus amigos Michael e Jesus que sempre estiveram comigo durante essa jornada e sempre me apoiaram nos momentos difíceis.

A Professora Dra. Patricia Salomão Garcia pelas risadas, guloseimas e ensinamentos.

E por último, mas não menos importante, à minha companheira, amiga e parceira Ingrid, que me incentivou a estudar depois de muitos anos, me incentivou a fazer ensino supletivo e entrar em uma faculdade e quem diria que seria em uma federal.

Obrigado novamente Deus por me dar sabedoria e força de vontade, só Ele sabe como foi difícil sair de um ensino defasado e cursar um ensino superior, sem saber o que era Química e estar concluindo essa etapa da minha vida.

RESUMO

RODRIGUES, Ricardo de Sousa. **Seleção de suportes para Imobilização de Lipases**. 2020. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2020.

O objetivo deste trabalho foi imobilizar lipases (lip) de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes suportes, por adsorção física e aplicar em reações de hidrólise de ésteres. Os suportes estudados foram: (1) óxido magnético de Cobalto (OMC); (2) sílica mesoporosa expandida (SMP); (3) estrutura metalorgânica de clusters de íons Fe (III) (MOF) e (4) polímero produzido por eletrofiação a base de quitosana (QE). A eficiência de imobilização (E) e a retenção da atividade (R) foram dosadas por hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). A eficiência de imobilização (E) foi de 68% para o OMC, 73% para a SMP e 90% para o MOF. Não houve imobilização enzimática para o QE. A retenção da atividade (R) foi de 170% para a SMP-lip e 400% para o MOF-lip. Não houve retenção da atividade para o OMC. A enzima imobilizada no melhor suporte (maior E e R) foi estudada quanto a estabilidade em solventes orgânicos (1 h; 25 °C): metanol (log P -0,76), isopropanol (log P -0,28), etanol (log P -0,24), acetona (log P -0,23), *n*-hexano (log P -3,50) e *n*-heptano (log P 4,0). As dosagens das atividades residuais foram realizadas por hidrólise do *p*NPP. Os resultados mostraram que a MOF-lip perdeu 60 e 30% da atividade catalítica quando incubadas em metanol e *n*-heptano respectivamente. Para os demais solventes a retenção da atividade foi 100%. Em seguida, reações de hidrólise de óleos vegetais (oliva, milho e girassol) foram realizadas com a MOF-lip. A atividade foi de 3200 U mg⁻¹ para a hidrólise do óleo de oliva e 2800 U mg⁻¹ para os óleos de milho e girassol. Os estudos indicaram que o MOF é um suporte promissor para imobilização de lipases e utilização em reações de hidrólise de ésteres.

Palavras-chave: Lipases. Enzimas. Imobilização. Suportes.

ABSTRACT

RODRIGUES, Ricardo de Sousa. **selection of supports for immobilizing lipases**. 2020. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2020.

In this work, lipases (lip) from *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 were immobilized on different supports, by physical adsorption and applied in ester hydrolysis reactions. The supports studied were: (1) Cobalt magnetic oxide (OMC); (2) expanded mesoporous silica (SMP); (3) metal-organic frameworks of Fe (III) ion (MOF) and (4) polymer produced by electrospinning based on chitosan (QE). Immobilization efficiency (E) and activity retention (R) were measured by hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP). The immobilization efficiency (E) was 68%, 73 and 90% respectively for the OMC. There was not enzymatic immobilization for the QE. Activity (R) retention was 170% for SMP-lip and 400% for MOF-lip. There was no retention of activity for the OMC. The enzyme immobilized on the best support (highest E and R) was studied for stability in organic solvents (1 h; 25 °C): methanol (log P -0.76), isopropanol (log P -0.28), ethanol (log P -0.24), acetone (log P -0.23), *n*-hexane (log P -3.50) and *n*-heptane (log P -4.0). The residual activities were carried by hydrolysis of the *p*NPP. Results showed that MOF-lip lost 60 and 30% of the catalytic activity when incubated in methanol and *n*-heptane, respectively. For other solvents, activity retention was 100%. Hydrolysis reactions of vegetable oils (olive, corn and sunflower) were carried out with MOF-lip. The activity was 3200 U mg⁻¹ for the hydrolysis of olive oil and 2800 U mg⁻¹ for corn and sunflower oils. The results indicated that MOF is a promising support for immobilizing lipases and for use in ester hydrolysis reactions.

Keywords: Lipases. Enzymes. Immobilization. Supports.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS e TABELAS

Figura 1 – Reação de hidrólise de um triacilglicerol na presença de lipase.11

Figura 2 – Reações catalisadas por lipases: esterificação, alcólise, acidólise, aminólise e transesterificação.11

Figura 3 – Lipase de *Pseudomonas fluorescens* na conformação LID aberta (A) e fechada (B).14

Figura 4 – Métodos de Imobilização enzimática.17

Figura 5 – Esquema do processo de imobilização das lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02.21

Figura 6 – Reação de hidrólise do pNPP catalisado pela lipase.23

Figura 7 – Estabilidade em solventes polares e apolares da lipase de *Burkholderia lata* LBBio imobilizada em MOF. Condições: O biocatalisador foi incubado por 1 h (25 °C), em metanol (M), etanol (E), isopropanol (Iso), Acetona (Ac), *n*-hexano (Hex) e *n*-heptano (Hep). Ensaios em triplicata.30

Figura 8 – Artigos encontrados no site sciencedirect.com com as palavras chaves: lípase, immobilization and MOF (Julho/2020).33

Quadro 1 – Microrganismos produtores de lipases segundo a literatura (1965-2011).13

Quadro 2 – Áreas de atuação e aplicação de lipases segundo literatura.15

Quadro 3 – Algumas vantagens e desvantagens na utilização de lipases microbianas.16

Quadro 4 – Materiais estudados no processo de imobilização de lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 e suas características.

Tabela 1 – Teor de ácidos graxos em óleos vegetais.

Tabela 2 – Eficiência da imobilização e Retenção da atividade em meio aquoso da lipase de *Burkholderia lata* imobilizada em diferentes suportes.27

Tabela 3 – Atividade específica para as diferentes preparações enzimáticas. A_{esp} : atividade

específica: $U_T/P_T = U \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Tabela 4 – Capacidade hidrolítica da enzima livre e imobilizada em MOF para diferentes óleos vegetais.32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_o – Atividade observada na enzima livre ($U\ g^{-1}$ do suporte)

A_t – Atividade teórica da enzima imobilizada ($U\ g^{-1}$ do suporte)

A_{t_f} – Atividade total final frente ao *p*NPP

A_{t_i} – Atividade total inicial frente ao *p*NPP

SiO₂-BDC – Suporte Híbrido de dióxido de Silício e Beta-ciclodextrina

MOF – Estrutura metalorgânica composta por clusters de íons Ferro (III)

FAT – Fundação André Tosello

LBBIO – Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos

Lip – Lipase

PS – Poliestireno

OMC – Óxido magnético de Cobalto

*p*NPP – Palmitato de *p*-nitrofenila

QE – Polímero eletrofiado a base de quitosana

R – Retenção de atividade enzimática

SiO₂-PVA – suporte híbrido de dióxido de silício e polivinilálcool

SMP – Silica mesoporosa expandida

U – Unidades totais de atividade ($\mu\text{mols do produto min}^{-1}$)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 LIPASES	11
3.1.1 <i>Aplicação de lipases</i>	14
3.1.2 <i>Vantagens e desvantagens na utilização de lipases</i>	16
3.2 Imobilização de enzimas e técnicas de imobilização	17
3.2.1 <i>Imobilização por adsorção</i>	18
3.2.2 <i>Imobilização por ligação covalente</i>	18
3.2.3 <i>Imobilização por retenção física</i>	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 MICRORGANISMO.....	20
4.2 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO	20
4.2.1 <i>Suportes</i>	20
4.2.2 <i>Procedimento de imobilização</i>	21
4.2.3 <i>Hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP)</i>	22
4.2.4 <i>Determinação da concentração de proteínas</i>	24
4.3 ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM SOLVENTES ORGÂNICOS	24
4.4 CAPACIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA EM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
5.1 SELEÇÃO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO.....	27
5.2 ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA EM DIVERSOS SOLVENTES	29
5.3 CAPACIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA EM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS	31
6 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas extremamente versáteis em reações com transferência de grupos acila e por essa característica são catalisadores promissores em diversos segmentos industriais, tais como, Bioenergético, Alimentício, Farmacêutico, Biotecnológico, entre outros. A demanda da sociedade por materiais oriundos de fontes renováveis e eco-amigáveis é uma realidade com qual estamos cada vez mais familiarizados, sendo assim, esse tema é frequentemente pautado em eventos que visam sustentabilidade. Os biocatalisadores apresentam grandes vantagens frente aos catalisadores inorgânicos, com destaque para elevada seletividade, pouca incidência na formação de produtos secundários e quando imobilizados podem possibilitar a reutilização do biocatalizador sem necessidade de tratamentos químicos ou purificação como ocorre com os catalisadores convencionais. Devido suas características, os biocatalisadores apresentam um grande potencial econômico e sustentável despertando interesse de vários e importantes setores da economia, assim, são um importante objeto de estudo e pesquisa (VILLENEUVE, 2007).

O alto custo de produção e a manutenção da estabilidade estrutural do biocatalizador durante uma reação química limitam sua utilização. Dessa forma, a imobilização é uma alternativa para minimizar estes inconvenientes (DATTA et al., 2013). Diferentes materiais, inorgânicos e orgânicos, têm sido estudados com a finalidade de manter ou melhorar a eficiência catalítica destes biocatalisadores, além disso, podem estender o tempo de reutilização (ANSARI; HUSAIN, 2012; BILAL et al., 2018; HU et al., 2018).

Dentro deste contexto, este trabalho contribuiu com os estudos de imobilização de lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, em suportes inorgânicos e orgânicos com posterior aplicação em hidrólise de óleos vegetais (oliva, girassol e milho).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Imobilizar, por adsorção física, lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em materiais inorgânicos e orgânicos e aplicar a enzima imobilizada em reações de hidrólise de óleos vegetais (oliva, girassol e milho).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

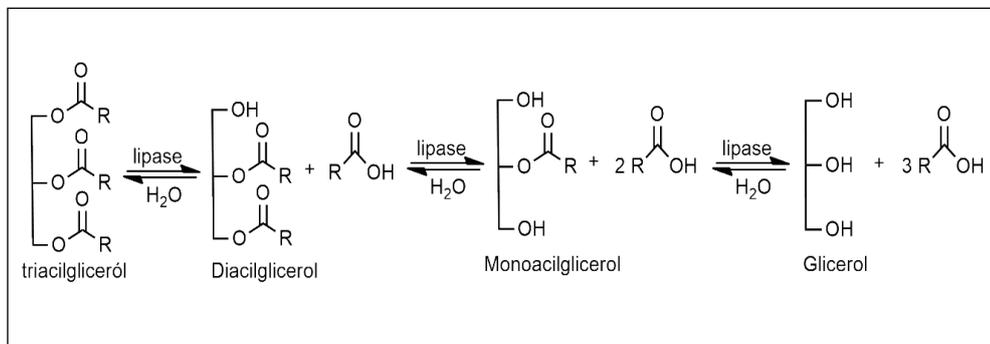
- Estudar a eficiência da imobilização (E) e a retenção da atividade (R) por hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP);
- Selecionar o suporte com maior E e R;
- Estudar a estabilidade da enzima imobilizada (para o melhor suporte) em diferentes solventes: Metanol (log P -0,76), Isopropanol (log P -0,28), Etanol (log P -0,24), Acetona (log P -0,23), *n*-Hexano (log P 3,50) e *n*-Heptano (log P 4,0);
- Aplicar a lipase imobilizada no melhor suporte em reações de hidrólise de óleos vegetais: oliva, girassol e milho.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LIPASES

As lipases (3.1.1.3) são biocatalisadores multifuncionais e eficientes, capazes de catalisar reações hidrolíticas de triacilgliceróis de cadeia longa em ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Figura 1) (SVENDSEN, 2000; GUPTA et al., 2007; SHARMA et al., 2011; GEOFFRY, 2018). Diferentemente das esterases, as lipases tem a capacidade de hidrolisar triacilgliceróis de cadeias longas, ou seja, triacilgliceróis constituídos por 10 ou mais átomos de carbono (JAEGER et al., 1999; RHEE et al., 2005; CÔTÉ; SHARECK, 2008). Atuam em substratos com baixa solubilidade em água, especificamente na interface água-lipídio, catalisando reações como: esterificação, transesterificação, aminólise, alcólise dentre outras (Figura 2) (KRISHNA; KARANTH, 2001; GOTOR, 2002).

Figura 1 – Reação de hidrólise de um triacilglicerol na presença de lipase.

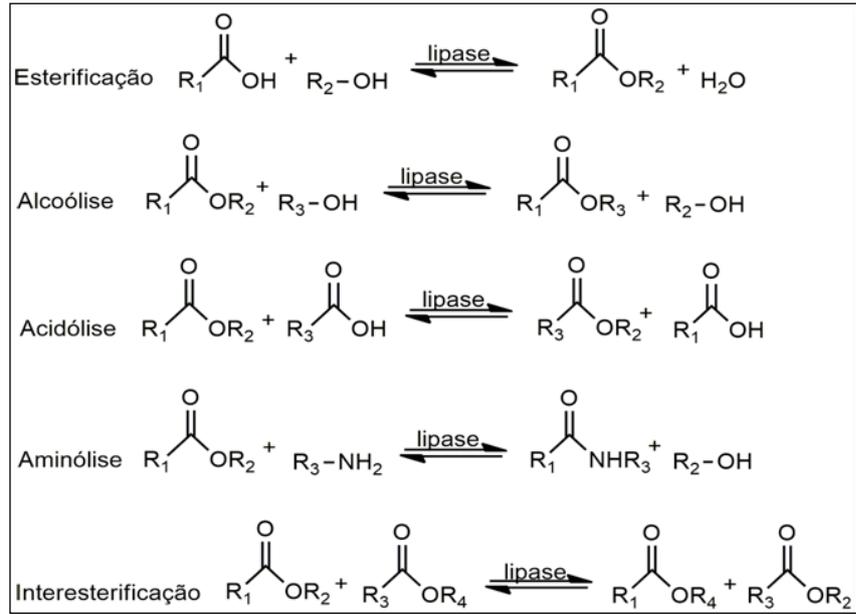


Fonte: Autoria própria (2019).

Essas biomoléculas são produzidas somente por organismos vivos, tais como fungos, bactérias, plantas e animais (SAXENA et al., 2003), com destaque especial aos microorganismos (Quadro 1).

Atualmente uma das áreas de pesquisa envolvendo a produção de lipases está direcionada no uso de diferentes microrganismos, suplementos, substratos e meios de cultivo a fim de aperfeiçoar a produção e encontrar a melhor combinação desses fatores.

Figura 2 – Reações catalisadas por lipases: esterificação, alcólise, acidólise, aminólise e transesterificação.



Fonte: adaptado de BARON (2008).

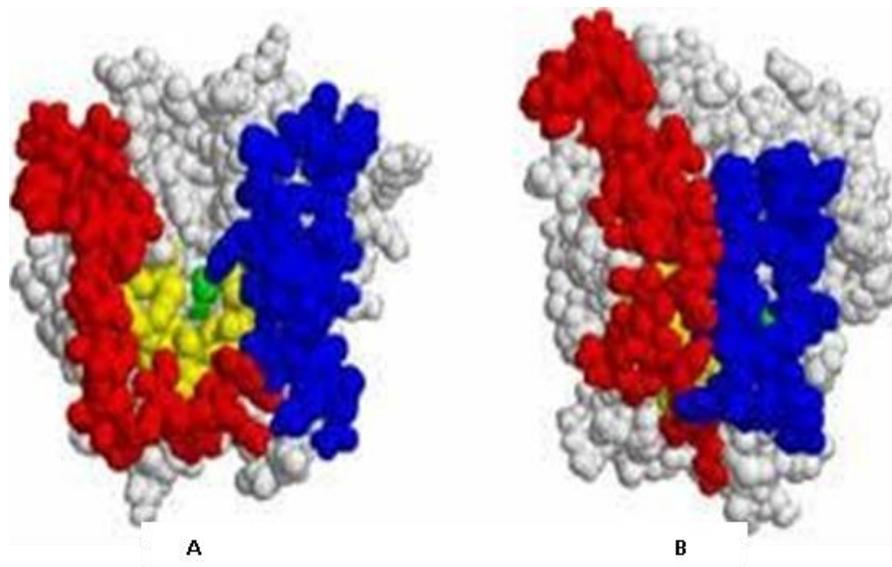
Quadro 1 – Microrganismos produtores de lipases segundo a literatura (1965-2011).

Origem	Micro-organismos	Referências
Arqueobactérias	<i>Natronococcus sp.</i>	Boutaiba et al. (2006).
Bactérias (Gram-positivas)	<i>Bacillus stearothermophilus MC 7</i>	Kambourova et al. (2003).
	<i>B. meagterium</i>	Lima et al. (2004).
	<i>Burkholderia glumae</i>	Khattabi et al. (2003).
	<i>B. cepacia</i>	Fernandes et al. (2007).
	<i>Ralstonia sp.</i>	Yoo et al. (2011).
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Shah; Wilson (1965).
	<i>S. epidermidis</i>	Simons et al. (1998).
	<i>S. xyloisus</i>	Mosbah et al. (2007).
Bactérias (Gram-negativas)	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Jaeger; Reetz (1998).
	<i>Photobacterium lipolyticum</i>	Yang; Sohn; Kim (2009).
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Jaeger et al. (1997).
	<i>P. mendocina</i>	Jaeger; Reetz (1998).
	<i>P. fluorescens HU380</i>	Kojima; Shimizu (2003).
	<i>Serratia marcescens</i>	Jaeger et al. (1997).
Actinomicetos	<i>Streptomyces cinnamomeus Tü89</i>	Sommer; Bormann; Götz (1997).
	<i>S. coelicolor Candida rugosacolor A3(2)</i>	Côté; Shareck (2008).
Fungos leveduriformes	<i>Candida rugosa</i>	Dalmau et al. (2000).
	<i>C. cylindracea</i>	Brozzoli et al. (2009).
	<i>Torulopsis ernobii</i>	Yoshida; Motai; Iichishima (1968).
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	Costas; Deive; Longo (2004).
Fungos filamentosos	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Domínguez et al. (2003).
	<i>Antrodia cinnamomea</i>	Lin; Wang; Sung (2006).
	<i>Alternaria sp.</i>	Tom; Crisan. (1975).
	<i>Aspergillus carneus</i>	Saxena et al. (2003).
	<i>A. terreus</i>	Gulati et al. (1999).
	<i>A. niger</i>	Edwinoliver et al. (2010).
	<i>A. oryzae</i>	Toida et al. (2000).
	<i>Beauveria bassiana</i>	Hegedus; Khachatourians (1988).
	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	Messias et al. (2009).
	<i>Botrytis cinerea</i>	Comménil et al. (1999).
	<i>Cunninghamella verticillata</i>	Gopinath et al. (2002).
	<i>Geotrichum sp.</i>	Burket et al. (2004).
	<i>Fusarium globulosum</i>	Gulati et al. (2005).
	<i>Mucor circinelloides</i>	Prazeres; Cruz; Pastore (2006).
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima et al. (2003).
	<i>P. citrinum</i>	Miranda et al. (1999).
	<i>P. restrictum</i>	Cammarota; Freire (2006).
	<i>P. simplicissimum</i>	Gutarra et al. (2007).
	<i>P. verrucosum</i>	Kempka et al. (2008).
	<i>P. verrucosum</i>	Jaeger; Reetz (1998).
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Li; Wang; Tan (2006).	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sun; Xu (2009).	
<i>R. homothallicus</i>	Diaz et al. (2006).	
<i>R. oryzae</i>	Essamri; Deyris; Comeau (1998).	
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Fernandes et al. (2004).	
<i>Trichoderma viride</i>	Kashmiri; Adnan; Butt (2006).	

Fonte: Adaptado de Messias et al. (2011).

As enzimas em geral apresentam comportamento parecido quando atuam entre a interface água/substrato, geralmente sofrem desnaturação irreversível quando empregadas em condições de alta tensão interfacial ou então são expulsas da interface em situações de baixa tensão (STAMATIS, 1999). Porém alguns estudos envolvendo lipases indicam que essas enzimas podem fazer parte da interface água-lipídeos e permanecer completamente ativas mesmo em áreas de baixa tensão interfacial, sendo essa uma característica singular das lipases (VERGER et al., 1984). Uma vez que a concentração do substrato excede o limite de solubilidade, a reação hidrolítica catalisada pela lipase aumenta drasticamente, ou seja, quando o substrato está presente na forma de micelas ou como gotas de emulsão (REIS et al., 2009). O sítio ativo da enzima é envolto por uma “tampa” denominada lid (Figura 3), que pode sofrer alterações em sua conformação deixando o sítio ativo da lipase mais exposto e susceptível à interação com o substrato, aumentando assim sua atividade lipolítica. A esse fenômeno é atribuído o nome de ativação interfacial (THOMAS et al., 2005).

Figura 3 – Lipase de *Pseudomonas fluorescens* na conformação LID aberta (A) e fechada (B).



Fonte: Adaptado de Nagarajam (2012).

3.1.1 Aplicação de lipases

Diferentes aplicações das lipases são relatadas em estudos anteriores (Quadro 2). Na biotecnologia, as lipases são responsáveis por transações envolvendo bilhões de dólares

(JAEGER e REETZ, 1999).

Na produção de cosméticos, por exemplo, elas atuam como ingredientes ativos ou como biocatalisadores na síntese de produtos químicos específicos, principalmente ésteres, aromas e agentes ativos (ANSORGE-SCHUMACHER, 2013).

Quadro 2 – Áreas de atuação e aplicação de lipases segundo literatura.

Área de Desenvolvimento	Reações catalisadas por lipases	Aplicação do produto obtido	Referências
Biotecnologia	Transesterificação	Produção de biocombustíveis (biodiesel)	Jambulingam; Shalma e Shankar (2019).
	Esterificação	Reduzir, remover ou remediar contaminações por petróleo e derivados através da biorremediação	Mita et al. (2010).
Ind. Alimentícia	Hidrólise e Esterificação	Intensificação de sabores em produtos Lácteos	Zhang et al. (2016).
	Interesterificação	Produção de substitutos da manteiga e outros aditivos utilizados em cereais e Aperitivos	Liu; Chang e Liu (2007).
Indústria de detergentes	Hidrólise de ácidos graxos	Fabricação de produtos de limpeza, industriais ou domésticos	Khoo; Brandford e Javaid (2010).
	Hidrólise de ácidos graxos	Remover manchas de gordura (lipídios) e manchas difíceis	Dumore e Mukhopadhyay (2012).
Farmacêutica	Hidrólise regioseletiva, acilação e transesterificação	É um composto importante utilizado na síntese de medicamentos	Mori e Kagechika (2017).
	Hidrólise regioseletiva, acilação e transesterificação	Resolução de fármacos quirais e compostos opticamente ativos, como alguns álcoois amplamente utilizados na indústria farmacêutica	Sanfilippo, Paterno e Patti (2018).
Outras aplicações	Hidrólise enantioselectiva	Indústrias químicas finas, formulação de pesticidas	Hasan, Shah e Hameed (2006).
	Hidrólise de ácidos graxos e derivados	Tratamento de resíduos (degradação de resíduos orgânicos, tratamento de esgoto, limpeza de tanques de retenção e fossas sépticas)	Selvakumar e Sivashanmugam (2018).
	Hidrólise de triacilgliceróis	Fabricação de couro (Desengorduramento)	Lyu et al. (2017).

Fonte: Autoria Própria (2019).

3.1.2 Vantagens e desvantagens na utilização de lipases

Embora as lipases apresentem grande poder catalítico e ofereçam à possibilidade de se trabalhar em condições reacionais brandas, quando são empregadas em sua forma livre, apresentam alguns inconvenientes que dificultam sua aplicação em larga escala. O quadro 3 apresenta algumas vantagens e desvantagens da utilização das lipases no setor industrial.

Quadro 3 – Algumas vantagens e desvantagens na utilização de lipases microbianas.

Vantagens	São produzidas por fontes renováveis;	Saxena et al. (2003).
	Variedade de microrganismos produtores;	Messias et al. (2011).
	Atuam em condições reacionais Brandas;	Rassy et al. (2004).
	Detém de um alto poder catalítico;	Lehninger (2006).
	São versáteis quanto ao uso de substratos;	Krieger et al. (2004).
	Apresentam Químio, régio e enantioselectividade;	Faber (2004).
Desvantagens	Desnaturam frente alguns solventes orgânicos;	Castro e Knubovets (2003).
	Desnaturam em altas temperaturas;	Mitchell et al. (2006).
	Custo de produção (definido pelo rendimento de produção);	Salihu et al. (2012).
	Difícil recuperação do biocatalisador;	Sebrão et al. (2007).

Fonte: Autoria própria (2019).

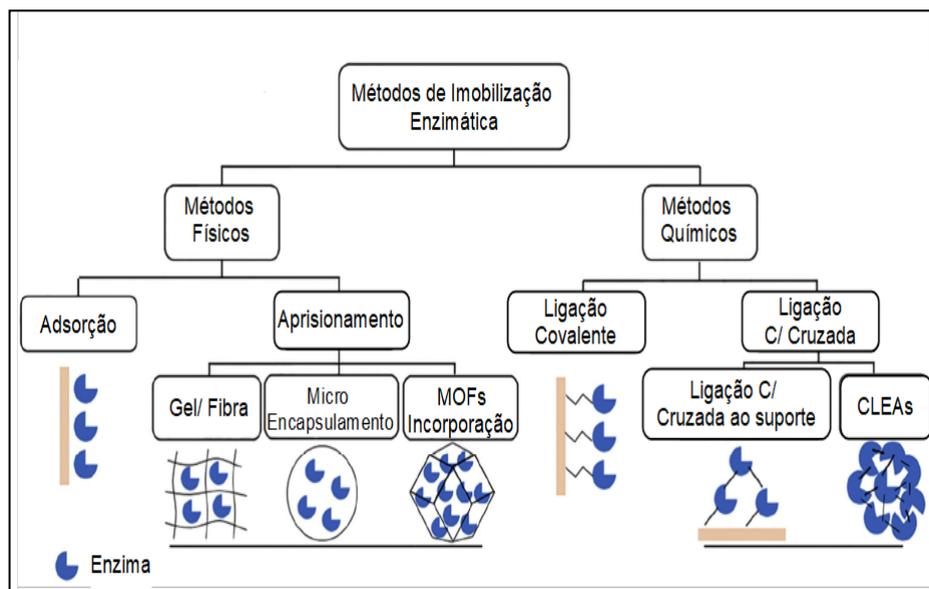
Adicionalmente a esses estudos, as técnicas de imobilização de enzimas, vêm se desenvolvendo nos últimos anos a fim de diminuir a baixa recuperação e reutilização destes catalisadores, maximizando a possibilidade de aplicação em escalas industriais (KIM et al., 2019; ALI et al., 2016; KUMAR et al., 2019; JOSHI, 2019). Para os estudos de imobilização, são empregados, preferencialmente, materiais de baixo custo e/ou que mantenham a atividade catalítica ao mesmo tempo que agreguem certa estabilidade às enzimas perante os variados ambientes de aplicação como solventes orgânicos, variações de pH e temperatura (SEBRÃO et al., 2007).

3.2 Imobilização de enzimas e técnicas de imobilização

Uma enzima imobilizada é uma enzima sob-confinamento em um suporte (material), de forma que sua mobilidade (grau de liberdade) esteja restrita a área do suporte, e com atividade catalítica pode estável por um período de tempo (ARROYO, 1998). A técnica de imobilização enzimática apresenta uma série de vantagens quanto ao uso de enzimas em sua forma livre, como: (a) reutilização do biocatalizador; (b) facilidade na separação e purificação dos produtos reacionais; (c) maior estabilidade frente a variações de temperatura e pH, (d) método economicamente mais viável devido ausência da necessidade de purificar o produto reacional; (e) melhor controle das reações químicas e suas variáveis, podendo resultar em um aumento do rendimento reacional quando comparadas as em sua forma livre (GUPTA; BHATTACHARYA; MURTHY, 2013).

A imobilização de enzimas pode ser feita por variadas metodologias, que se baseiam essencialmente em características físicas e químicas do suporte e da enzima. Na literatura podemos encontrar enzimas sendo imobilizadas nos mais diversificados materiais tanto de natureza orgânica quanto inorgânica (Figura 4) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; LIU; CHEN; SHI, 2018).

Figura 4 – Métodos de Imobilização enzimática.



Fonte: Adaptado de Liu; Chen; Shi (2018).

3.2.1 Imobilização por adsorção

O método de imobilização por adsorção é o mais utilizado, devido a sua simplicidade e por ser mais econômico frente aos outros métodos. Este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, por atrações eletrostáticas ou hidrofóbicas como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo. Quando empregada, esta metodologia pode influenciar em uma pequena mudança na estrutura tridimensional da enzima, porém insuficiente para causar perda de atividade catalítica por desnaturação. A eficiência deste método está relacionada diretamente com fatores como o tamanho da enzima, área superficial do adsorvente, porosidade, tamanho do poro, temperatura e pH da solução enzimática. Os melhores resultados para adsorção se encontram quando o pH do meio de imobilização está próximo ao ponto isoelétrico da enzima, assim os níveis de repulsão eletrostática entre as moléculas são mínimos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VINU et al., 2005).

3.2.2 Imobilização por ligação covalente

Este método baseia-se na formação de ligações químicas de caráter covalente, podendo ser ligações cruzadas enzima-enzima ou enzima-suporte. Estas ligações são estabelecidas entre grupos dos resíduos de aminoácidos constituintes da enzima juntamente com os grupos reativos do suporte. Devido a forte interação entre enzima e suporte esta técnica pode promover a perda da atividade enzimática, isso ocorre pela ocorrência de modificações na estrutura nativa da enzima, além de exigir condições que favoreçam o processo de imobilização, como alto controle de pH e força iônica, esses parâmetros são modificados no intuito de ampliar a reatividade dos grupos aminoácidos constituintes da enzima (FORESTI; FERREIRA, 2007; MATEO et al., 2010). As vantagens deste processo são a estabilidade da enzima após imobilização frente a efeitos do meio reacional (temperatura, pH, ação de agente inibidores), além de evitar a dessorção da enzima no suporte devido a força dessas interações (MENDES et al., 2011).

3.2.3 Imobilização por retenção física

A imobilização por retenção física é também conhecida por aprisionamento ou encapsulação e ocorre quando existe a retenção física da enzima dentro da cavidade de uma matriz, podendo ser sólida, porosa ou delimitada por uma membrana. A limitação desta técnica é justamente a velocidade com o qual o substrato e os produtos formados difundem-se pela membrana e também o quão efetivo é o aprisionamento. Neste caso, substratos de baixa massa obtêm maiores rendimentos quando em reação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI; 2004; MENDES et al., 2011).

Estudos de imobilização enzimática em sílica mesoporosa relatam que o diâmetro médio de uma lipase se aproxima de 4,5 nm e que o tamanho ótimo do poro para imobilização por aprisionamento seja de aproximadamente 9 nm (GUSTAFSSON et al., 2012).

Para MOFs, a retenção física ocorre com algumas proteínas de baixa massa molecular e meso MOFs isto é com poros acima de 2 nm (Carvalho et al., 2015), como por exemplo a Microperoxidase-11 (MP-11) (1,8 kDa) em Cu-MOF com área de 1260 m²/g e tamanho do poro de 1,78 nm (PISKLAK et al., 2006) e mioglobina (16,7 kDa) em Tb-mesoMOF (tamanho de poros de 3 a 4,1 nm) (LYKOURINOOU et al., 2011).

Considerando as informações sobre os suportes empregados neste trabalho (Quadro 4) e as técnicas de imobilização citadas, o tipo de imobilização neste trabalho foi a adsorção física.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

As lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 (massa molecular 32 kDa), utilizadas neste trabalho, foram isoladas no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBIO) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis, em uma contaminação da cultura fúngica e identificada por métodos morfológicos e moleculares (16S rRNA) na Fundação André Tosello (FAT).

A produção, por fermentação submersa, foi realizada pela professora Dra Valéria Marta Gomes do Nascimento e gentilmente cedida para o grupo Biopase (UTFPR-AP) para estudos de biocatálise.

Em estudos anteriores, as lipases de *B. lata* LBBIO-BL02 apresentaram características desejáveis para a imobilização e aplicação em biocatálise. Por exemplo, atividade máxima na temperatura de 55 °C e mantendo 60% de sua atividade inicial após 1h a 60 °C. Em relação à estabilidade em solventes orgânicos, a enzima na forma livre, manteve 100% da atividade inicial em tolueno, *n*-hexano e *n*-heptano e apresentou estabilidade de 78%, 76% e 90% quando incubada com 50% (v/v) de metanol, etanol e isopropanol, respectivamente.

Além disso, as enzimas foram imobilizadas até o momento, somente em Celite (OLIVEIRA, 2017), o que justificaria a continuidade dos estudos relacionados à utilização de novos suportes para imobilização das lipases de *B. lata* LBBIO-BL02.

4.2 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO

4.2.1 Suportes

Com a finalidade de agregar valor final ao produto, quatro suportes foram testados para imobilização das lipases de *B. lata* LBBIO-BL02. Esses materiais foram sintetizados por outros grupos da UTFPR câmpus Apucarana e são pouco aplicados na área da catálise enzimática (Quadro 4).

Quadro 4 – Materiais estudados no processo de imobilização de lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 e suas características.

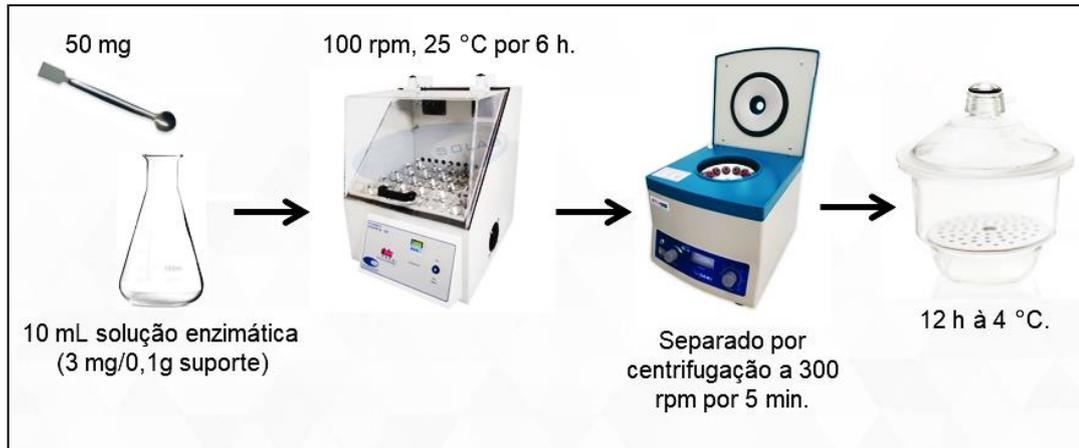
Material	Características
1. Óxido magnético de Cobalto (CoO.Co ₂ O ₃) (OMC)	Material não poroso com propriedades magnéticas.
2. Sílica mesoporosa (SMP)	Sílica mesoporosa com área específica de aproximadamente 320 m ² g ⁻¹ .
3. Estrutura metalorgânica (MOFs)	Estrutura metalorgânica formada por clusters de íons Fe (III) e moléculas de ácido tereftálico, material microporoso com área específica aproximadamente de 514 m ² g ⁻¹ . Tamanho médio e volume do poro 1,16 nm (microporoso) e 0,05 cm ³ g ⁻¹ respectivamente.
4. Polímero a base de Quitosana produzido por eletro-fiação (QE)	Polímero natural, não poroso e hidrofóbico.

Fonte: Autoria própria (2019).

4.2.2 Procedimento de imobilização

Os suportes (1 g) foram lavados com porções de 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 a 0,05 mol L⁻¹. Após secagem em dessecador, utilizou-se o método de imobilização proposto por Al-Duri e Yong (1999). Para a imobilização, 50 mg de cada suporte e 10 mL de solução enzimática (3 mg de proteína/0,1 g de suporte), foram colocados em um erlenmeyer (25 mL) e agitados a 100 rpm (25 °C) por 6 h. O suporte foi separado por centrifugação (300 rpm, 5 min), lavado com 2 mL de tampão fosfato (pH 7, 0,05 mol L⁻¹), seco em dessecador a vácuo por 12 h e armazenado a 4 °C conforme a Figura 5. O sobrenadante foi recolhido para dosagem de proteína e atividade lipolítica residual.

Figura 5 – Esquema do processo de imobilização das lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02.



Fonte: Adaptado de Baron (2008).

Os resultados de eficiência de imobilização (E) e Retenção de atividade (R) foram a partir das equações 1 e 2, respectivamente (YADAV; JADHAV; 2005; BON et al., 1986):

$$E = \frac{(At_i - At_f) \cdot 100}{At_i} \quad (1) \quad R = \frac{A_o \cdot 100}{A_T} \quad (2)$$

Onde:

At_i : Atividade total inicial frente ao *p*NPP, anterior à imobilização (U);

At_f : atividade total final frente ao *p*NPP no sobrenadante após a imobilização (U);

A_o : atividade observada da enzima imobilizada (U g⁻¹ do suporte);

A_T : atividade teórica da enzima imobilizada (U g⁻¹ do suporte);

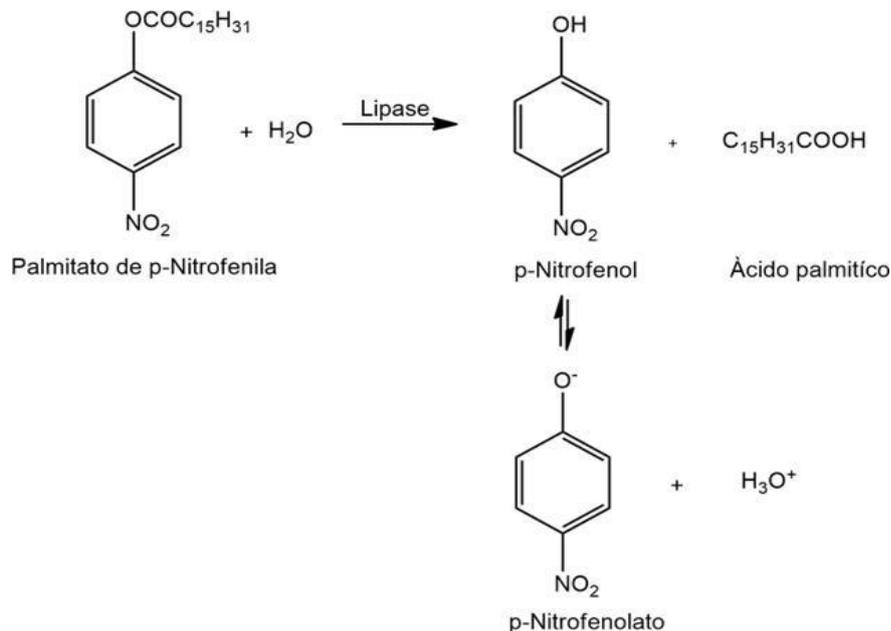
U: unidades totais de atividade (μmols do produto min⁻¹).

Para calcular a eficiência (E), foi considerado a atividade inicial e final do sobrenadante, frente à reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio aquoso. Para calcular a retenção de atividade (R), foi considerada a atividade da enzima imobilizada em meio aquoso.

4.2.3 Hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP)

O método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (WINKLER; STUCKMANN, 1979), foi empregado para determinar 1) a atividade enzimática do extrato enzimático bruto antes e após imobilização (para o cálculo de E), 2) a atividade enzimática da enzima imobilizada e 3) a retenção da atividade enzimática. Este baseia-se na hidrólise do *p*NPP pela enzima, em meio aquoso, contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela foi seguida a 410 nm (Figura 6).

Figura 6 – Reação de hidrólise do *p*NPP catalisado pela lipase.



Fonte: adaptado de BARON (2008).

A dosagem da atividade lipolítica da enzima livre ocorreu utilizando 0,5 mL da solução A (3 mg de palmitato de *p*-nitrofenila/mL de isopropanol) e 4,5 mL de solução B (2 g de Triton X-100; 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0). Desta solução, foram colocados 0,9 mL em cubeta e após estabilização da temperatura a $55 \text{ }^\circ\text{C}$, adicionou-se 0,1 mL da solução de enzima ou de tampão, quando se prepara o branco. A reação é realizada em cubeta de 1,0 mL e a cinética da reação foi acompanhada pela leitura das absorvâncias a cada 20 s durante 1 min (410 nm).

A dosagem da atividade para as enzimas imobilizadas foi realizada utilizando 0,5 mL da solução A, 4,5 mL da solução B e 1 mg do suporte contendo as enzimas. O meio reacional

foi incubado a 55 °C e a cada minuto, em um total de cinco, alíquotas de 1 mL foram retiradas para uma cubeta para simultânea leitura das absorvâncias (410 nm), em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.4 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas no extrato enzimático (inicial) e posterior à imobilização foram determinados a partir do método de Bradford (1976) e os ensaios realizados em triplicata.

4.3 ESTABILIDADE DA LIPASE IMOBILIZADA EM SOLVENTES ORGÂNICOS

A estabilidade da enzima imobilizada para o melhor suporte (MOF) foi estudada em solventes orgânicos. Quatro solventes polares e dois apolares foram testados: metanol (log P - 0,76), isopropanol (log P -0,28), etanol (log P -0,24) e acetona (log P -0,23); *n*-heptano (log P 4,0) e *n*-hexano (log P 3,50).

Nestes ensaios, adicionou-se 0,5 mL do solvente à 5 mg da enzima imobilizada e incubou-se a 25 °C por 1 h. Após a incubação, removeu-se o solvente e a enzima imobilizada foi seca em dessecador (12 h). Utilizou-se 1 mg da enzima imobilizada para determinar a atividade residual da enzima pelo método do *p*NPP aquoso (4.2.3). Os ensaios foram realizados em triplicata.

O MOF utilizado neste trabalho é originário do Laboratório de Química de Materiais e Tecnologias Sustentáveis – LAQMATS, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus de Apucarana, supervisionado pelo Prof. Dr. Alesandro Bail.

4.4 CAPACIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA EM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS

A capacidade hidrolítica (ou atividade hidrolítica) da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 livre e imobilizada (MOF) foram estudadas em óleos vegetais: Oliva, Soja e Girassol que contêm diversificada composição de ácidos graxos (Tabela 1). Utilizou-se o método titulométrico proposto por Stuer et al., (1986), com modificações, que é baseado na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis presentes no óleo com hidróxido de sódio (NaOH). O meio reacional constitui de 0,2 mol L⁻¹ de substrato (18 g de óleo para 100 mL de emulsão), 6% (m/v) de Triton X-100 e tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0. O meio reacional foi adicionado em erlenmeyer sendo constituído de 5 mL da emulsão com 200 µL do extrato enzimático (para a enzima livre) ou 5,0 mg da enzima imobilizada. A reação transcorreu durante 30 min a 55 °C e 150 rpm. Após, 16 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol são adicionados e esta solução é titulada com NaOH 0,1 mol L⁻¹ utilizando fenolftaleína como indicador. Para cada óleo, um controle (branco) contendo o meio reacional sem enzima foi realizado nas mesmas condições. Os ensaios foram feitos em duplicatas.

Tabela 1 – Teor de ácidos graxos em óleos vegetais (%).

Óleos	Ácido graxo saturado	Ácido graxo monoinsaturado	Ácido graxo poliinsaturado	
			Linoléico	Linolênico
Girassol	11	2	69	-
Milho	13	25	61	1
Oliva	14	77	8	<1
Soja	15	24,5	54	7

Fonte: Adaptado da Revista.Fi.com; FOOD INGREDIENTS BRASIL (2014).

A atividade pode ser calculada pela equação 3 e uma unidade de atividade de hidrólise (U) é definida como 1 µmol de ácido graxo produzidos por minuto e por mL ou mg da enzima nas condições descritas acima.

$$A = \frac{(Va - Vb) \cdot M}{Et} \quad (3)$$

Onde:

A: atividade hidrolítica U = µmol min⁻¹.g⁻¹ (para a enzima imobilizada) ou µmol min⁻¹.g⁻¹ (para a enzima livre);

Va e Vb: volume de solução de NaOH (µL) gasto na titulação da amostra e do branco,

respectivamente;

M: concentração $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NaOH;

E: quantidade de enzima em g ou mL;

t: tempo de reação (min).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SELEÇÃO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO

Foram estudados quatro suportes, como mostra a Tabela 2, sendo avaliada a eficiência de imobilização e a retenção da atividade em meio aquoso (método da hidrólise do *p*NPP, 4.2.3).

Estes parâmetros são importantes, pois indicam a quantidade de enzima que foi adsorvida nos suportes (E) e quanto da enzima está ativa depois do procedimento de imobilização (R). A capacidade de adsorção de proteínas foi maior quando a enzima foi imobilizada no MOF (E de 90%), seguido da SMP (73%) e Co_3O_4 (68%). Não houve imobilização para QE.

Tabela 2 – Eficiência da imobilização e Retenção da atividade em meio aquoso da lipase de *Burkholderia lata* imobilizada em diferentes suportes.

Suporte	E (%) ^a	A _T (U mg ⁻¹)	A _O (U mg ⁻¹)	R (%) ^b
OMC	68	0,7	-	-
MOF	90	0,9	3,6	400
SMP	73	0,7	1,2	170
QE	-	-	-	-

(a) Eficiência (%) – calculada por diferença entre a atividade inicial da solução enzimática e a atividade final do sobrenadante após a imobilização. (b) Retenção - atividade real observada da enzima imobilizada/atividade teórica da enzima imobilizada por mg do suporte. Atividade de ambas calculada pelo método do *p*NPP aquoso (55°C). Ensaios realizados em duplicata e apresentados em valor médio.

Entretanto, o fato de haver alguma eficiência na imobilização, não garante que a enzima está ativa no suporte, pois este parâmetro apenas mostra o desaparecimento da atividade no sobrenadante após a imobilização, por isso, a comparação da eficiência de imobilização com outros trabalhos deve ser evitada. Para analisar se a enzima estava ativa após a imobilização, foram feitos os ensaios de atividade da enzima imobilizada (A_O), utilizando-se o método da hidrólise do *p*NPP em meio aquoso.

Embora E para OMC tenha sido de 68%, não houve retenção da atividade, ou seja, as lipases adsorvidas ficaram inativas após a imobilização. A retenção da atividade (R) foi maior que 100% para o MOF e SMP. Este parâmetro indica quanto da enzima está ativa no suporte após o processo de imobilização em comparação com a enzima livre. Os valores de retenção são dependentes da imobilização, do suporte e do meio reacional. Retenções distintas de 100% indicam a ocorrência de modificações estruturais na enzima favoráveis ou não à catálise, após a imobilização. No caso deste trabalho, os valores de retenção indicaram que durante a imobilização, a enzima sofreu ativação interfacial, ou seja, as mudanças conformacionais foram favoráveis à catálise.

A atividade específica (atividade frente ao *p*NPP por mg de proteína) foi calculada para as lipases livre (antes da imobilização) e as imobilizadas onde se observou retenção da atividade (SMP-lip e MOF-lip). A atividade específica foi de $89,3 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$ para a enzima livre. A quantidade de proteína não é específico para a lipase, já que o a lipase de *B. lata* não está purificada e o método de Bradford quantifica todas as proteínas presentes no extrato. Para SMP-lip, a atividade específica foi de $268 \pm 2,1 \text{ U mg}^{-1}$ ou seja 3 vezes maior quando comparada a da enzima livre. É possível que a imobilização neste suporte tenha sido de forma seletiva (preferencialmente lipases). Estes resultados poderiam ser confirmados por técnica de eletroforese SDS-PAGE. Para o MOF-lip, não foi possível calcular a atividade específica, o MOF interferiu na coloração do sobrenadante enzimático o que ocasionou em erros na leitura da quantidade de proteína.

Estes resultados mostram que o MOF e SMP são suportes promissores para imobilização de lipases e aplicação em biocatálise. Porém, para este trabalho, optou-se por continuar os estudos utilizando apenas a enzima imobilizada em MOF. Por isso, algumas considerações em relação a esses materiais serão feitas.

As estruturas metal-orgânicas (MOFs) passaram a ser empregadas recentemente na imobilização de enzimas e apresentaram um enorme potencial principalmente por serem materiais cristalinos e porosos, possuem elevada área superficial (tipicamente de 1000 a 10.000 m^2/g e possibilitar o desenvolvimento de estruturas voltadas para a finalidade de imobilização, com cavidades ajustáveis e bem definidas (YAP et al., 2017). Atualmente os MOFs vêm recebendo grande atenção devido a estabilidade térmica e química do catalisador na forma de MOF-Enzima, além de manter a atividade enzimática por vários ciclos de reutilização (PU et al., 2019).

As técnicas para imobilização de enzimas em MOFs, relatadas até o momento na literatura, incluem os métodos de aprisionamento, a adsorção e ligação covalente. Para os dois

últimos, a imobilização na superfície do MOF é mais utilizada. Esses métodos foram utilizados para imobilizar diversos tipos de enzimas como as lipases (NADAR; RATHOD, 2018), as peroxidase (CHULKAIVALSUCARIT et al., 2015), a anidrase carbônica (LIU et al., 2018), a catalase (LIAO et al., 2017), entre outras. No entanto, esses métodos geralmente diminuem a eficiência catalítica da enzima quando comparada a sua forma livre, principalmente devido à dificuldade de acesso ao substrato, a perda de parte do seu grau de liberdade e em alguns casos transição estrutural desfavorável da enzima, ocasionada pela interação da mesma com suporte. Essa modificação estrutural pode não ser prejudicial em alguns casos e provocar o aumento da atividade enzimática por exposição do sítio ativo enzimático (ZHANG, Y et al., 2015).

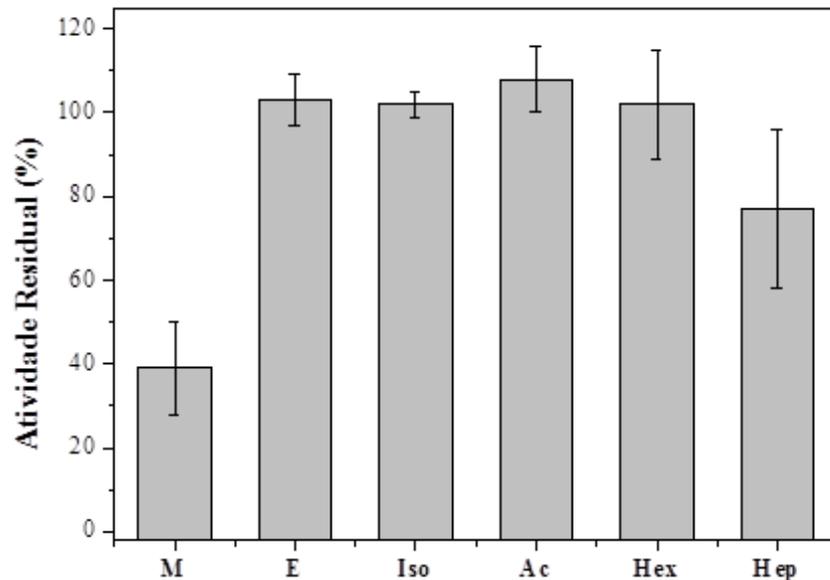
Em geral, enzimas e substratos com elevado tamanho molecular e MOFs com tamanho de poro pequeno se adequam aos métodos de imobilização de superfície. Enquanto enzimas e substratos com pequeno tamanho molecular se adequam a ambos os métodos (superfície e aprisionamento). Como os MOFs possuem a capacidade de formar milhares de estruturas com características peculiares, eles se tornam um ótimo material de estudo e de imenso potencial (YINGLI et al., 2018).

5.2 ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA EM DIVERSOS SOLVENTES

As interações entre solventes orgânicos e os aminoácidos constituintes da enzima podem influenciar na eficiência catalítica da enzima durante uma reação. A ocorrência de pequenas mudanças conformacionais na estrutura nativa da enzima pode expor ou obstruir o seu sítio catalítico, portanto o estudo da estabilidade frente a diferentes solventes é muito importante tanto para enzima livre como para enzima imobilizada (KUNTS; KAUSMANN; 1974; RUPLEY, et al., 1983).

O estudo de estabilidade da MOF-lip em metanol log P -0,76; isopropanol log p -0,28; etanol log P -0,24; acetona log P -0,23; *n*-hexano log P 3,50 e *n*-heptano log P 4,0 (Figura 7) mostrou que entre os solventes polares, a maior estabilidade foi em a acetona ($108 \pm 8\%$, 25 °C, 1 h) e menor em metanol ($40 \pm 11\%$). Para os apolares a estabilidade foi $102 \pm 13\%$ para o *n*-hexano e $77 \pm 19\%$ para o *n*-heptano.

Figura 7 – Estabilidade em solventes polares e apolares da lipase de *Burkholderia lata* LBBio immobilizada em MOF. Condições: O biocatalisador foi incubado por 1 h (25 °C), em metanol (M), etanol (E), isopropanol (Iso), Acetona (Ac), *n*-hexano (Hex) e *n*-heptano (Hep). Ensaio em triplicata.



Fonte: Autoria própria (2019).

Oliveira et al., (2015) estudou a estabilidade, em diferentes solventes orgânicos, da lipase de *B. lata* LBBIO livre (extrato bruto) (1 h, 25 °C) e immobilizada em celite (CEL-lip). Esse suporte consiste principalmente em sílica SiO₂ (91,5%) com tamanho médio de partícula de 0,002 mm² (faixa 0,02-0,1 mm). Para a enzima livre e para os solventes polares, a atividade residual (estabilidade) foi maior em isopropanol e acetona $162,7\% \pm 7,2$ e $72,5\% \pm 9,8$ respectivamente. Em etanol a atividade residual foi de $28,2 \pm 8,4\%$, além disso, não houve atividade residual quando a enzima foi incubada em metanol. Para o *n*-hexano e *n*-heptano, a atividade residual foi de $257,0 \pm 5,4$ e $261,5 \pm 8,2$ respectivamente. Considerando a CEL-lip, a estabilidade em solventes polares foram semelhantes para o etanol ($37,7\% \pm 3,1$), acetona ($36,7\% \pm 3,0$) e metanol ($33,0\% \pm 5,3$) sendo menor para o isopropanol ($21,7\% \pm 0,6$). Em se tratando de solventes apolares, a estabilidade da CEL-lip foi maior em *n*-hexano ($115,4\% \pm 3,0$) e menor para o *n*-heptano ($59,5\% \pm 6,0$).

Para este trabalho, pode-se considerar que após a imobilização em MOF, a estabilidade da enzima aumentou para os solventes polares, mas diminuiu para os apolares quando comparado com a enzima livre. Além disso, a MOF-lip foi mais estável que a CEL-lip quando em presença de todos os solventes, exceto para o *n*-hexano onde a estabilidade foi muito semelhante.

5.3 CAPACIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA EM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS

Os resultados para a capacidade hidrolítica em óleos vegetais mostram que a MOF-lip tem maior eficiência ao catalisar os óleos de menor grau de instauração, como o óleo de oliva, que é composto predominantemente de ácidos graxos monoinsaturados (Tabela 1). Para os óleos de milho e girassol, compostos em maior proporção por ácidos graxos poli-insaturados, a capacidade de hidrólise foi a mesma. É possível que a enzima teve sua conformação parcialmente modificada após a imobilização, pois não se observa o mesmo perfil para a capacidade hidrolítica da enzima livre, que apresentou maior atividade para o óleo de girassol e a mesma atividade para os óleos de milho e oliva (Tabela 3).

Tabela 3 – Capacidade hidrolítica da enzima livre (EL) e MOF-lip para diferentes óleos vegetais. Ensaios em duplicata e os resultados representados em média.

Substratos	EL (U mL⁻¹)	MOF-lip (U g⁻¹)
Girassol	49	2800
Milho	62	2800
Oliva	62	3200

Fonte: Autoria própria (2020).

Levando em consideração lipases de *B. lata*, Tamahiro et al., (2015) estudaram a aplicação destas enzimas imobilizadas em Celite 545 (na hidrólise de óleos vegetais). A atividade de hidrólise foi de 94 U g⁻¹ para os óleos de oliva e girassol e 122 U g⁻¹ para o óleo de milho (Tabela 4).

Em se tratando de outras lipases do gênero *Burkholderia*, imobilizadas em diferentes suportes e utilizadas em reações de hidrólise de óleos vegetais, exceto para a lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA, onde se observou uma atividade muito próxima das obtidas neste trabalho, a MOF-lip apresentou atividade enzimática muito superior se comparada aos demais estudos (Tabela 4).

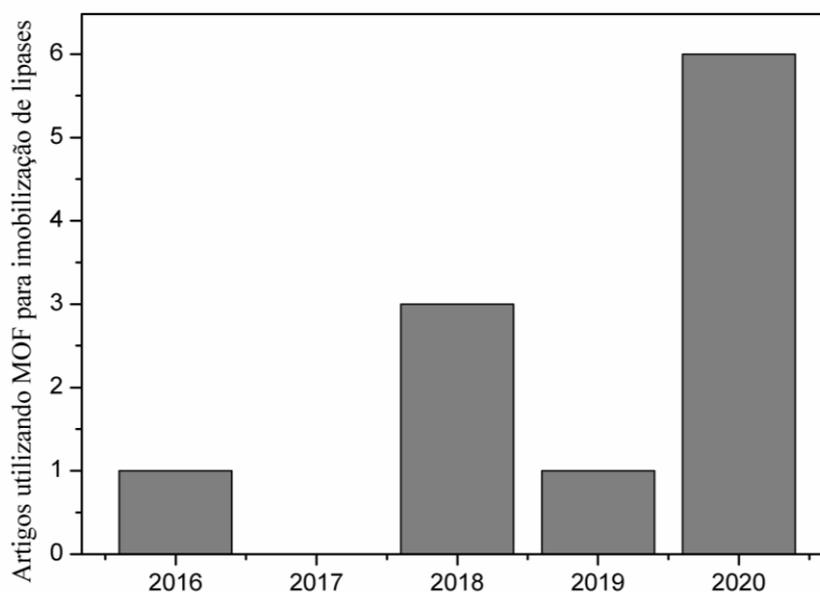
Tabela 4 – Capacidade hidrolítica para diferentes óleos vegetais de lipases de *Burkholderia* imobilizadas em diferentes suportes.

Lipase/Suporte	Condições reacionais	Óleos vegetais	Atividade U g ⁻¹	Ref.
<i>Burkholderia</i> <i>sp.</i> C20 Celite	1 mL de substrato, 5% (m/v) de goma arábica e 10% de azeite, 200 mg Celite-lip, pH 9,0 e 55 °C por 12 min	Oliva	175	Liu et al. (2009)
<i>B. lata</i> Celite	0,2 mol L ⁻¹ substrato, 6% (m/v) Triton X-100, 74% v/v tampão citrato fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0); 5 mL da emulsão, 0,115 g Celite-lip, 30 min, 55 °C e 300 rpm	Oliva Girassol Milho	94 94 122	Tamahiro et al. (2015)
<i>B. cepacia</i> (Sigma-Aldrich)	Substrato: 50 mL azeite, 50 mL goma arábica (7%, m/v); meio: 5 mL emulsão; 2 mL tampão Fosfato 0,01 M; pH 7,0; 0,1g de enzima imobilizada; 10 min; 37°C; 200 rpm.	Oliva	66	Araki et al. (2018)
<i>B. cepacia</i> (Amano) SiO ₂ -BCD	Substrato: emulsões de azeite de oliva a (10–50% m/v) correspondentes ao ácido graxo, concentrações variando de 372 a 1860 mM; pH 7,0 e 37 C.	Oliva	1637	Martin et al. (2018)
<i>B. cepacia</i> (Amano) SiO ₂ -PVA	Substrato: 50 mL azeite/50 mL reagente de emulsificação. Reação: 5 mL emulsão, 2 mL de 100 mM tampão fosfato; pH 7,0; 100-250 mg de enzima imobilizada; 10-30 min.	Oliva	3224 2919 2804	Mijone et al. (2019)
<i>B. lata</i> MOF	0,2 mol L ⁻¹ de substrato (18 g de óleo para 100 mL de emulsão), 6% (m/v) de Triton X-100 e tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,0); 5 mL da emulsão, 5,0 mg MOF-lip, 30 min, 55 °C e 150 rpm.	Oliva Girassol Milho	3200 2800 2800	Este trabalho

Fonte: autoria própria (2020)

Poucos trabalhos são encontrados na literatura utilizando MOF para imobilização de lipases. No site *sciencedirect.com*, por exemplo, apenas 11 trabalhos foram encontrados até o momento, sendo um artigo de revisão (Figura 8).

Figura 8 – Artigos encontrados no site sciencedirect.com com as palavras chaves: lipase, immobilization e MOF (Julho/2020).



Fonte: autoria própria (2020).

A Tabela 5 descreve de forma resumida alguns trabalhos onde se utilizou MOFs para imobilizar lipases. Observa-se comumente alguns processos de imobilização (covalente, encapsulação e adsorção/afinidade) e materiais variados. Por exemplo, os íons metálicos empregados são em geral Fe^{3+} , mas outros como Zn^{2+} e Zr^{4+} também são encontrados. A funcionalização com material orgânico normalmente ocorre com grupamentos carboxílicos desde cadeias simples como acetato e outras de maior complexidade como ácido trimésico. Por se tratar de novos materiais, observa-se que os autores apresentam além da caracterização dos MOFs, os benefícios que estes suportes podem apresentar ao serem empregados na imobilização de lipases.

Tabela 5 – Utilização de MOFs para imobilização de lipases.

MOF	Tipo de imobilização/lipase	Principais Resultados	Ref.
Nanopartículas magnética de Fe ₃ O ₄ com grupo carboxílico (acetato)	I) ligação covalente II) afinidade íon metal-enzima <i>Candida rugosa</i> (Sigma)	I) E 83,48 ± 2,13%; R 73,81 ± 1,08; atividade residual de 74,04% após 10 reusos na hidrólise do óleo de oliva II) E 87,20 ± 1,80%; R 76,15 ± 0,91; atividade residual de 61,16% após 10 reusos na hidrólise do óleo de oliva	Wang et al. (2016)
Fe-BTC Cloreto ferrico e ácido trimésico	Encapsulação <i>Cândida antarctica B</i>	Processo rápido (10 min); eficiência de encapsulamento até 87% e retenção atividade de 97% para hidrólise do pNPA	Gáscon et al. (2017)
ZIF-8 Zeólita de acetato de zinco com 2-metilimidazol	Encapsulação <i>Aspergillus niger</i> (Sigma)	Retenção de atividade de 135%; apresentou maior estabilidade térmica em relação à livre; 54% de atividade após 7 reusos na hidrólise do pNPA.	Nadar e Rathod (2019)
UiO-66-NH ₂ ZrCl ₄ com ácido 2-aminotereftálico	Ligação reticulada por precipitação Lipase pancreática (PPL- Sigma)	R 104,4%; o método recém-desenvolvido forneceu uma nova ferramenta para encontrar moléculas bioativas de ervas naturais	Chen et al. (2020).
UiO-66-NH ₂	Ligação covalente (reticulação) <i>Candida rugosa</i> (Sigma)	A enzima imobilizada foi mais tolerante à faixa de pH estudada e mais estável à temperatura em relação a enzima livre; Apresentou 4 reusos sem perdas da atividade para a hidrólise do (R,S)-MPAME	Chen et al. (2020).
Bio-MOF: acetato de zinco e adenina	Encapsulação (mineralização biomimética) <i>Alcaligenes sp.</i>	Síntese de biodiesel por transesterificação com conversão > 80% óleo/metanol (2:1); após 5 ciclos de reutilização houve perda de 20% na eficiência catalítica..	Li et al. (2020)

MPAME: metilato de 2-(4-Metilfenil) propionila; pNPA: acetato de p-nitrofenila

Fonte: Autoria própria (2020).

6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram concluir que:

- (I) Dentre os suportes estudados o MOF apresentou os melhores resultados tanto para eficiência de imobilização (E) quanto na retenção da atividade (R);
- (II) O estudo de estabilidade da MOF-lip em solventes orgânicos, mostrou que a enzima imobilizada apresentou melhor estabilidade em solventes polares de baixo coeficiente de partição ($\log P$), em acetona houve ativação interfacial. Para o metanol a enzima livre não apresentou estabilidade, porém, a imobilizada manteve 40% da atividade catalítica;
- (III) A MOF-lip foi capaz de catalisar a hidrólise de diferentes ácidos graxos, tendo um melhor desempenho para o óleo de oliva (3200 U g^{-1}), com composição predominante de ésteres monoinsaturados.

REFERÊNCIAS

AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase Immobilization: an equilibrium study on lipases immobilized on hydrophobic supports. **Bioscience Biotechnol. Biochem.** v. 69, p. 833-835, 2005.

ALI, Z. et al. Immobilization of Lipase on Mesoporous With Hierarchical Fibrous Pore. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 129-135, 2016.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology advances**. v. 30, p. 512-532, 2012.

ARAKI, C. A.; Et al. Effects of a combination of lipases immobilised on desilicated and thiol-modified ZSM-5 for the synthesis of ethyl esters from macauba pulp oil in a solvent-free system. **Applied Catalysis A: General**, v. 562, p. 241-249, 2018.

ARROYO, M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. **Ars. Pharmaceutica**, v. 39, p. 23-39, 1998.

BARON, A. M. **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para utilização em Biocatálise**. 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BILAU, M. et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530-2544, 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 54-248, 1976.

CARVALHO, N. B. et al. Use of modified silicas for lipase immobilization. **Quim. Nova**, v. 38, p. 399-409, 2015.

CHEN, J.; SUN, B.; ZHANG, P.; XU, W.; LIU, Y.; XIONG, B.; TANG, K. (2020). Immobilization of lipase AYS on UiO-66-NH₂ metal-organic framework nanoparticles as a recyclable biocatalyst for ester hydrolysis and kinetic resolution. **Seraration and Purification Technology**. Doi: 10.1016/j.seppur.2020.117398

CHEN, X. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto a metal-organic framework, PPL@MOF: A new platform for efficient ligand discovery from natural herbs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1099, p. 94-102, 2020.

CHULKAIVALSUCHARIT, P. et al. Synthesis of enzyme-embedded metal-organic framework. **nanocrystals in reverse micelles**. v. 5, p. 293-296, 2015.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Enzyme Microb. Technol.**, v. 42, p. 381-388, 2008.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipase imbolizadas em polímeros. **Quimica Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DANTAS, A. **Imobilização e caracterização da lipase ns-40116 em poliestireno**. 2017. 114 f, Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos) –Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotech**, v. 3, p. 1–9, 2013.

DUMORE, N. S.; MUKHOPADHYAY, M. Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase. **International Biodeterioration e biodegradation**, v. 68, p. 65-70, 2012.

DWIVEDEE, B. P. et al. Development of nanobiocatalysts through the immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase for applications in efficient kinetic resolution of racemic compounds. **Bioresouce technology**, v. 239, p. 464-471, 2017.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. 5 ed. New York: Springer, 2004.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido e sua Utilização em Biocatálise**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2007.

FOOD INGREDIENTS BRASIL - FiB. Dossiê especial: óleos. Food Ingredients Brasil, Barueri, n. 31, p. 38-55, 2014.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme microb. Technol.**, v. 41, p. 62-70, 2007.

GASCÓN, V. et al. Semi-crystalline Fe-BTC MOF material as an efficient support for

enzyme immobilization. **Catalysis Today**, v. 304, p. 119-126, 2018.

GEOFFRY, k.; ACHUR, N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 241-253, 2018.

GONÇALVES, F. A. F. **Produção de Lipases Extracelular Por Leveduras em Cultivo Submerso**. 2007. 66 f, Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GOTOR, V. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. **J. Biotechnol**, v. 96, p. 35-42, 2002.

GUPTA, N., SAHAI, V., GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochem**, v. 42, p. 518-526, 2007.

GUSTAFSSON, H. et al. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica—The effect of varied particle size and morphology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 100, p. 22-30, 2012.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbiol. Technol**, v. 39, n. 1-2, p. 235-251, 2006.

HU, Y. et al. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 793-801, 2018.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology,

three dimensional structures and biotechnological application os lipases. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAMBULINGAM, R.; SHALMA, M.; SHANKAR, V. Biodiesel production using lipase immobilised functionalized magnetic nanocatalyst from oleaginous fungal lipid. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 245-258, 2019.

JOSHI, R.; SHARMA, R.; KUILA, A. Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe₃O₄ NPs for application in waste cooking oil degradation. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 134-140, 2019.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2006.

LIAO, F. S. et al. Shielding against unfolding by embedding enzymes in metal-organic frameworks via a de novo approach. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 139, p. 6530-6533, 2017.

LI, Q.; CHEN, Y.; BAI, S.; SHAO, X.; JIANG, L.; LI, Q. (2020). Immobilized lipase in bio-based metal-organic frameworks constructed by biomimetic mineralization: A sustainable biocatalyst for biodiesel synthesis. *Colloids Surf b. Biointerfaces*. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110812

Liu, C. H. et al. Characterization of Burkholderia lipase immobilized on celite carriers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 359-363, 2009.

LIU, Q. et al. User-tailored metal-organic frameworks as supports for carbonic anhydrase. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 10, p. 41326-41337, 2018.

LYU, B. et al. A cleaning and efficient approach to improve wet-blue sheepskin quality by enzymatic degreasing. **Journal of Cleaner Production**, v. 148, p. 701-708, 2017.

LIU, K. J.; CHANG, H. M.; LIU, K. M. Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1303-1311, 2007.

LIU, M.; D. CHEM, J.; SHY, P. Y. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p.332-242, 2018.

LYKOURINO, V. et al. Immobilization of MP-11 into a mesoporous metal-organic framework, MP-11@mesoMOF: a new platform for enzymatic catalysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, p. 10382-10385, 2011.

KHOO, A. A. K. A.; BRANDFORD, O. A.; JAVAID, M. Self injection of lipase – an extreme case for regulation in non-surgical cosmetic procedures. **Journal of Plastic, Reconstructive e Aesthetic Surgery**, v. 63, p. 6-8, 2010.

KIM, H. et al. Immobilized lipase-catalysed Esterification for Synthesis of Trimethylolpropane Triester as a Biolubricant. **Renewable Energy**, v.130, p. 489-494, 2019.

KUNTZ, I. D.; KAUFMANN, W.; Hydrophobic Effect on the Intrinsic Viscosity of Globular Proteins. **Springer**, v. 2, p. 277-283, 1974.

KUMAR, A. et al. SiO₂ microparticles with carbon nanotube-derived mesopores as an

eficiente support for enzyme immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 359, p. 1252-1264, 2019.

KRIEGER, N. et al. Non aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 42, p. 279–286, 2004.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1547, p. 262-267, 2001.

MARTIN, L. S. et al. Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, p. 462–470, 2018.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000.

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

MENDES, A. A. et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of industrial microbiology e biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055–66, 2011.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e tecnológicas, Londrina**, v.32, p. 213-234, 2011.

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. 1164-1173, 2020.

MITA, L. et al. Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. **Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 133-141, 2010.

MITCHELL, D. A. et al. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.

MORI, S.; KAGECHIKA, H. Utility of lipase-catalyzed reactions for nonnatural molecules bearing a boron cluster: Application to Medicinal Chemistry. In: MATSUDA, **Future Directions in Biocatalysis**. Tokio: Elsevier, 2017. p. 251-256.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Encapsulation of lipase within metal-organic framework (MOF) with enhanced activity intensified under ultrasound. **Enzyme Microb. Technol.** V. 108, 2018.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Immobilization of proline activated lipase within metal organic framework (MOF). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 1108-1112, 2020.

NAGARAJAM, S. New Tools for Exploring –Old Friends—Microbial Lipases. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 168, p. 1163-1196, 2012.

OLIVEIRA, H. B. **Produção e Purificação da Lipase de Burkholderia lata LBBIO- BL02, sua caracterização Cinética e Aplicação em Reações de Biocatálise de Interesse Farmacológico e Industrial.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.

PASCOAL, A. et al. REVIEW: Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 119-196, 2018.

PISKLAK, T. J. et al. Hybrid materials for immobilization of MP-11 catalyst. **Top Catal.** V.38, p. 78-269, 2006.

RASSY, E.; PERRARD, A.; PIERRE, C. Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in Hydrophobic solvents: Bi-Bi ping-Pong Kinetics. **J. mol. Catal. B: Enzym.**, v. 30, p. 137-150, 2004.

RHEE, J. K. et al. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Appl. Environ. Microbiol.**, V. 71, n. 2 p. 817-825, 2005.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147, p. 237-250, 2009.

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

RUPLEY, J. A. et al. Water and globular proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 8, p. 18-22, 1983.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44, 2012.

SANFILIPPO, C.; PATERNO, A. A.; PATTI, A. Resolution of racemic amines via lipase-catalyzed benzoylation: Chemoenzymatic synthesis of the pharmacologically active isomers of labetalol. **Molecular Catalysis**, v. 449, p. 79-84, 2018.

SARGAZI, G. et al. Ultrasound assisted reverse micelle efficient synthesis of new Ta-MOF@Fe₃O₄ core/shell nanostructures as a novel candidate for lipase immobilization. **Materials Science and Engineering: C.**, v. 93, p. 768-775, 2018.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Meth.**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SEBRÃO, D. et al. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química nova**, v. 30, p. 1182-1187, 2007.

SELVAKUMAR, P.; SIVASHANMUGAM, P. Multi-hydrolytic biocatalyst from organic solid waste and its application in municipal waste activated sludge pre-treatment towards energy recovery. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 117, p. 1-10, 2018.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. **Biotechnology**, v. 10, p. 23-40, 2011.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular 143 lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 168, p. 1070 - 1074, 1986.

SVENDSEN, A. Review: lipase protein engineering. **Biochim. Biophys. Act.** v. 1543, 233-238, 2000.

TAMAHIRO, P. et al. Hidrólise de diferentes óleos e gorduras por lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 livre e imobilizada em celite 545. in: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 20., 2015, Fortaleza. **Anais do simposio nacional de bioprocessos**. Ceará, 2015.

THOMAS, A. et al. Role LidHydrophobicity Pattern in pancreatic lipase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 40074-40083, 2005.

VERGER, R. et al. Regulation by the γ -interfacial quality of some biological activities. **Colloides and surfaces**, v.10, p.163-180, 1984.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biptechnol. Advances**, v. 25, p. 515-536, 2007.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **J. physical Chem.**, v. 109, p. 6436-6441, 2005.

WANG, J. et al. Facile preparation of Fe₃O₄@MOF core-shell microspheres for lipase Immobilization. **Engineers**, v. 69, p. 139-145, 2016.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, p. 663-670, 1979.

YAP, M. H.; FOW, K. L.; CHEM, G. Z. Synthesis and applications of MOF-derived porous nanostructures. **Green Energy Environ**, v. 2, p. 218-245, 2017.

YINGLI, Hu. et al. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs). V. 91, p. 793-801, 2018.

ZHANG, Y. et al. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. **ACS Catal.**, v. 5, p. 4503-4513, 2015.

ZHANG, X. M. et al. Lipase-catalyzed modification of the flavor profiles in recombined skim milk products by enriching the volatile components. **Journal of Dairy Science**, v.99, p. 8665-8679, 2016.

ZHANG, Y. H. P. et al. Toward low-cost biomanufacturing through in vitro synthetic biology: bottom-up design. **Journal of Materials Chemistry**, v. 47, p. 18849-19172, 2011.

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.