

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

EFEITO DO CO₂ EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS COMO PRÉ-TRATAMENTO DA
LIPASE DE *Thermomyces Lanuginosus* IMOBILIZADA

RAYSA RAMOS DE OLIVEIRA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EFEITO DO CO₂ EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS COMO PRÉ-TRATAMENTO DA
LIPASE DE *Thermomyces Lanuginosus* IMOBILIZADA

RAYSA RAMOS DE OLIVEIRA

Sob a Orientação da Professora Dra.
Ana Iraidy Santa Brígida

e Coorientação da Dra.
Marisa Fernandes Mendes

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, no Curso de Pós-
Graduação em Engenharia Química, Área de
concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ
Agosto de 2019

048e

Oliveira, Raysa Ramos de, 1992-

Efeito do CO₂ em condições supercríticas como pré tratamento da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada / Raysa Ramos de Oliveira. - Seropédica, 2019.

83 f.

Orientadora: Ana Iraidy Santa Brígida.

Coorientadora: Marisa Fernandes Mendes.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2019.

1. Lipase. 2. Imobilização de enzimas. 3. Fluido supercrítico. 4. Planejamento de experimental. I. Brígida, Ana Iraidy Santa, 1981-, orient. II. Mendes, Marisa Fernandes, 1972-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RAYSA RAMOS DE OLIVEIRA

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de concentração em Tecnologia Química

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/08/2019.

Ana Iraidy Santa Brígida, D. Sc., EMBRAPA
(Orientadora)

Marisa Fernandes Mendes, D. Sc., DEQ/IT/UFRRJ
(Coorientadora)

Cristiane de Souza Siqueira Pereira, D. Sc., USS

Leda Maria Fortes Gottschalk, D. Sc., EMBRAPA

Renata Nunes Oliveira, D. Sc., DEQ/IT/UFRRJ

Dedico aos meus pais, Cosme Oliveira e Solange Oliveira, e ao meu marido, Guilherme Machado por todo apoio durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por ter me guardado e me orientado frente todas as dificuldades enfrentadas durante a minha vida;

Aos meus pais, Cosme e Solange que mesmo na ausência se fizeram presentes, me dando forças e apoio em cada decisão que tomei;

Ao meu marido Guilherme, que sempre foi muito paciente e compreensível;

À Ana Iraidy, pela confiança, apoio e dedicação a minha orientação;

À Marisa Mendes, pela colaboração e oportunidade de fazer parte da sua equipe maravilhosa;

À Camila Motta, pela cumplicidade desde o início do mestrado;

Aos meus amigos do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustível, pelas ajudas/dicas das apresentações, pelos perrengues que passamos juntos e solucionamos juntos, por trazerem leveza durante esse período enlouquecedor;

À Jéssica Silva da EMBRAPA que me ajudou com as análises de DSC;

À Erika Souza da EMBRAPA, pela ajuda em relação à análise de teor de proteínas;

À todos que conheci na EMBRAPA, pela ajuda e conhecimento compartilhado;

Ao Dr. Mário Geraldo, pela orientação e ajuda com as análises de FTIR;

A todos os professores que exercem essa profissão com tanta dedicação compartilhando conhecimentos e histórias. Tenho muito orgulho de ter tido professores assim, e me espelho em vocês;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade;

À FAPERJ, pelo apoio financeiro ao projeto;

Ao CNPq/PIBIC, pela bolsa de Iniciação Científica;

E a todos, não menos importante, mas que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

RESUMO

DE OLIVEIRA, Raysa Ramos. **Efeito do CO₂ em condições supercríticas como pré-tratamento da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

As enzimas apresentam uma grande perspectiva considerando sua aplicação como biocatalisador nos mais diversos segmentos. Contudo, seu elevado custo e baixa estabilidade são ainda considerados fatores limitantes em processos de escala industrial. Por esse motivo, estudos focados na imobilização e, recentemente, no pré-tratamento utilizando meios não convencionais têm se mostrado favoráveis frente à essas desvantagens. A presente dissertação teve como objetivo imobilizar a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em suportes aniônico (Amberlite IRA400 Cl⁻) e catiônico (Amberlite IR120 Na⁺) por meio da adsorção iônica, em seguida, avaliar os efeitos da condição supercrítica do CO₂ sobre a TLL imobilizada e compará-la com a TLL comercial (Lipozyme TL IM). Foi observado que o suporte Amberlite IRA400 Cl⁻ apresentou melhores resultados de atividade e teor de proteína frente ao Amberlite IR120 Na⁺. Posteriormente, os efeitos das condições supercríticas do dióxido de carbono sobre a atividade hidrolítica e estabilidade enzimática também foram avaliados. Os experimentos foram conduzidos de acordo com um planejamento experimental, variando a temperatura de 35 a 75 °C, a pressão de 80 a 300 bar e o tempo de exposição de 1 a 6 h. Os resultados mostraram uma redução da atividade da TLL imobilizada em Amberlite IR120 Na⁺ em todas as condições propostas. Por outro lado, foi observado uma superativação em até 57% em relação a atividade medida antes do pré-tratamento para a TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻. Em seguida, o mesmo procedimento experimental foi aplicado à Lipozyme TL IM. Para este, foi notado uma superativação de 18% na mesma condição proposta para a TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ (75 °C, 300 bar e 6 h). Em relação às mudanças nas ligações presentes no suporte e na enzima, não foram observadas alterações relevantes. Contudo, foi possível observar pela análise de calorimetria exploratória diferencial que o CO₂ atuou com um protetor no complexo enzima-suporte para a Lipozyme TL IM aumentando a estabilidade dessa lipase, enquanto que nos outros suportes foi observado uma maior degradação das proteínas. Por último, foi verificado que o aumento da concentração do substrato (p-nitrofenil laurato) acarretou em uma inativação tanto da lipase livre, quanto na imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ e comercialmente. Sendo o maior efeito observado na TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻.

Palavras-chave: Lipases. Imobilização de enzimas. Fluido supercrítico. Planejamento experimental.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Raysa Ramos. **Efeito do CO₂ em condições supercríticas como pré-tratamento da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada.** Seropédica, 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2019.

Enzymes present a great perspective considering their application as a biocatalyst in the many sectors. However, their high cost and low stability are still considered limiting factors in industrial-scale processes. For this reason, studies focused on immobilization and, recently, pretreatment using non-conventional media have been favorable in view of these disadvantages. This dissertation aimed to immobilize *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) in anionic (Amberlite IRA400 Cl⁻) and cationic (Amberlite IR120 Na⁺) supports by ionic adsorption, then evaluate the effects of the supercritical condition of CO₂ on Immobilized TLL and compare it with the commercial TLL (Lipozyme TL IM). It was observed that the support Amberlite IRA400 Cl⁻ presented better results of activity and protein content compared to Amberlite IR120 Na⁺. Afterward, the effects of carbon dioxide supercritical conditions on hydrolytic activity and enzymatic stability were evaluated. The experiments were conducted according to experimental design, varying the temperature from 35 to 75 °C, the pressure from 80 to 300 bar and the exposure time from 1 to 6 h. The results showed an inactivation of immobilized TLL in Amberlite IR120 Na⁺ under all proposed conditions. On the other hand, it was observed an overactivation up to 57% in relation to of activity measured before pretreatment for immobilized TLL in Amberlite IRA400 Cl⁻. Then, the same experimental procedure was applied to Lipozyme TL IM (commercially immobilized lipase), aiming at a comparison between commercial and immobilized lipase in this study. For this, an overactivation of 18% was noted under the same condition proposed for TLL immobilized on Amberlite IRA400 Cl⁻ (75 °C, 300 bar, and 6 h). Regarding changes in the chemical binding of support and enzyme, no relevant changes were observed. However, it was possible to observe that by the differential exploratory calorimetry analysis that CO₂ acted as a protector for Lipozyme TL IM increasing the stability of this lipase, while in the other supports a greater protein degradation was observed. Finally, it was found that the increase in substrate concentration (p-nitrophenyl laurate) resulted in inactivation of both free and immobilized lipase in Amberlite IRA400 Cl⁻ and commercially. Being the largest effect observed on the immobilized TLL in Amberlite IRA400 Cl⁻.

Keywords: Lipases. Enzyme immobilization. Supercritical fluid. Experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo da estrutura da lipase pancreática.....	4
Figura 2 - Estrutura da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> em sua conformação aberta. Em laranja, a tampa (α -hélice móvel) e, em verde, os resíduos de aminoácidos (Ser 146, Asp 201 e His 258) que compõem o sítio ativo.....	5
Figura 3 - Métodos de imobilização enzimática.....	6
Figura 4 - Diagrama de fases do dióxido de carbono.....	9
Figura 5 - Diagrama esquemático das etapas experimentais realizadas nesta dissertação.....	17
Figura 6 – Procedimento de ativação do suporte Amberlite IR120 Na ⁺ com uma solução de ácido clorídrico.....	18
Figura 7 - Procedimento de Imobilizada da TLL através da técnica de adsorção iônica.....	18
Figura 8 - Fluxograma do processo de pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico. E-1: cilindro de CO ₂ ; E-2: compressor de ar; E-3: filtro de ar; E-4: bomba de alta pressão; E-5: célula de alta pressão; E-6: banho termostático; V-1, V-2, V-3: válvula gaveta; V-4: válvula micrométrica.....	19
Figura 9 - Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier do suporte Amberlite IR120 Na ⁺ (em preto), da TLL imobilizada em Amberlite IR120 Na ⁺ antes (em azul) e após (em verde – experimento 1 e vermelho – experimento 10) o tratamento de CO ₂ supercrítico.....	28
Figura 10 - Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier do suporte Amberlite IRA400 Cl ⁻ (em preto), da TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl ⁻ antes (em azul) e após (em vermelho – experimento 8) o tratamento de CO ₂ supercrítico.....	32
Figura 11 - Diagrama de Pareto para a análise da atividade residual da Lipozyme TL IM pré-tratada com CO ₂ supercrítico.....	36
Figura 12 - Distribuição dos resíduos: valores preditos pelo modelo versus valores observados no experimento para atividade residual da Lipozyme TL IM.....	37
Figura 13 - Superfície de resposta da influência do tempo de exposição e pressão na atividade residual da Lipozyme TL IM.....	38
Figura 14 - Superfície de resposta da influência do tempo de exposição e temperatura na atividade residual da Lipozyme TL IM.....	38
Figura 15 - Superfície de resposta da influência da pressão e temperatura na atividade residual da Lipozyme TL IM.....	39

Figura 16 - Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier da Lipozyme TL IM antes (em preto) e após (em vermelho) o tratamento de CO₂ supercrítico. 39

Figura 17 – (a) Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação de hidrólise do p-NFL catalisada pela Lipase TL 100 L e (b) gráfico de duplo recíproco. 42

Figura 18 – (a) Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação de hidrólise do p-NFL catalisada pela TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ e (b) gráfico de duplo recíproco. 43

Figura 19 – (a) Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação de hidrólise do p-NFL catalisada pela Lipozyme TL IM e (b) gráfico de duplo recíproco. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do uso de solventes não aquosos em biocatálise.	7
Tabela 2 - Temperatura e pressão crítica de alguns fluidos usado em biocatálise.	10
Tabela 3 - Síntese das condições operacionais estudadas para pré-tratar enzimas em meios supercríticos.	14
Tabela 4 - Descrição e condições ótimas de uso da lipase comercial de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	16
Tabela 5 - Principais propriedades físicas e químicas de resinas sintéticas utilizadas como suporte para imobilização da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	17
Tabela 6 - Matriz de planejamento fatorial fracionado aplicada ao pré-tratamento da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada comercialmente e em suporte IR120 Na ⁺	20
Tabela 7 - Matriz de Planejamento Composto Central Rotacional aplicada ao pré-tratamento da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em suporte IRA400 Cl ⁻	21
Tabela 8 - Massa de enzima imobilizada usada para medição de atividade.	22
Tabela 9 - Parâmetros do processo de imobilização por adsorção da lipase de <i>T. lanuginosus</i> a pH 7 em suportes aniônico e catiônico após 2h de contato.	25
Tabela 10 - Resultado da atividade residual a partir do planejamento experimental para a lipase de <i>T. lanuginosus</i> imobilizada em IR120 Na ⁺	27
Tabela 11 - Grupos funcionais presentes no suporte Amberlite IR120 Na ⁺	27
Tabela 12 - Resultados da análise de DSC para TLL imobilizada em IR120 Na ⁺ antes e após o pré-tratamento com CO ₂ -SC.	29
Tabela 13 - Resultado de atividade residual da Lipase de <i>T. lanuginosus</i> imobilizada em IRA400 Cl ⁻ segregado por lote de imobilização.	30
Tabela 14 - Grupos funcionais presentes no suporte Amberlite IRA100 Cl ⁻	32
Tabela 15 - Resultados da análise de DSC para TLL imobilizada em IRA400 Cl ⁻ antes e após o pré-tratamento com CO ₂ -SC.	33
Tabela 16 - Resultado de atividade residual a partir do planejamento experimental para a Lipozyme TL IM.	34
Tabela 17 - Coeficientes do modelo de regressão, erro padrão, t-valor e p-valor correspondentes à atividade residual da Lipozyme TL IM.	35
Tabela 18 - Análise de variância para a atividade residual da Lipozyme TL IM.	36

Tabela 19 - Resultados da análise de DSC para a Lipozyme TL IM antes e após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.40

Tabela 20 – Velocidade máxima aparente obtida para a TLL tanto livre quanto imobilizadas.45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Enzimas	3
2.2. Lipases.....	3
2.2.1. Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	4
2.3. Métodos de imobilização.....	6
2.3.1. Adsorção	7
2.4. Meios reacionais e técnicas de pré-tratamento	7
2.4.1. Solventes orgânicos	8
2.4.2. Líquidos iônicos.....	8
2.4.3. Fluidos supercríticos	9
2.5. Considerações sobre a revisão bibliográfica	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Materiais	16
3.2. Metodologia experimental.....	17
3.2.1. Ativação do suporte	18
3.2.2. Imobilização da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	18
3.2.3. Pré-tratamento com CO ₂ supercrítico	19
3.2.4. Planejamento experimental.....	20
3.3. Métodos analíticos.....	21
3.3.1. Atividade hidrolítica em p-nitrofenil laurato (pNFL).....	21
3.3.2. Cálculo do rendimento de imobilização	22
3.3.3. Cálculo da atividade recuperada (At _{rec})	23
3.3.4. Determinação do teor de proteína	23
3.3.5. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR	24
3.3.6. Calorimetria exploratória diferencial – DSC	24
3.3.7. Efeito da concentração do substrato (p-NFL) sobre a velocidade de reação da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1. Parâmetros de imobilização.....	25
4.2. Estudo da lipase de <i>T. lanuginosus</i> imobilizada em Amberlite IR120 Na ⁺	26
4.2.1. Efeito do CO ₂ supercrítico sobre a atividade hidrolítica da TLL imobilizada	26
4.2.2. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR	27

4.2.3.	Calorimetria exploratória diferencial – DSC	29
4.3.	Estudo da lipase de <i>T. lanuginosus</i> imobilizada em Amberlite IRA400 Cl ⁻	30
4.3.1.	Efeito do CO ₂ supercrítico sobre a atividade hidrolítica da TLL imobilizada	30
4.3.2.	Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR	31
4.3.3.	Calorimetria exploratória diferencial – DSC	33
4.4.	Estudo da TLL imobilizada comercialmente (Lipozyme TL IM)	34
4.4.1.	Efeito do CO ₂ supercrítico sobre a atividade hidrolítica da TLL imobilizada comercialmente.....	34
4.4.2.	Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR	39
4.4.3.	Calorimetria exploratória diferencial – DSC	40
4.5.	Efeito da concentração do substrato (p-NFL) sobre a velocidade de reação da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	41
5.	CONCLUSÕES.....	46
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTURO.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	ANEXO A – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO	60
	APÊNDICE A – CURVAS DE DSC REFERENTE A TLL IMOBILIZADA EM AMBERLITE IR120 Na ⁺	61
	APÊNDICE B – CURVAS DE DSC REFERENTE A TLL IMOBILIZADA EM AMBERLITE IRA400 Cl ⁻	64
	APÊNDICE C – CURVAS DE DSC REFERENTE A LIPOZYME TL IM.....	67

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a biotecnologia tem contribuído consideravelmente na transição das práticas econômicas, porém não sustentáveis, para sistemas industriais renováveis, aliando inovação e sustentabilidade. O mercado global de enzimas industriais alcançou quase US\$ 4,9 bilhões em 2015. E deve aumentar para US\$ 6,3 bilhões em 2021 a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% (BBC, 2017). Segundo a Associação Brasileira de Biotecnologia Industrial, o uso de enzimas tem como finalidade aprimorar os processos industriais gerando produtos de alto valor agregado em diversos setores (CHIES, 2017). Sobretudo, as lipases, que apresentam uma vasta aplicação, desde o seu uso como ferramenta de pesquisa e desenvolvimento até no campo industrial.

Na indústria têxtil, as lipases são usadas normalmente em fibras naturais para degradação e posterior remoção dos inúmeros componentes naturais presentes na camada externa das fibras de algodão (AEHLE, 2007). Todavia, estudos recentes mostram resultados positivos usando lipases com a finalidade de aumentar as propriedades de umidificação e de absorventes dos tecidos sintéticos, como nylon e poliéster (EL-HENNAWI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2010; DJORDJEVIC *et al.*, 2005). Utiliza-se as lipases em grande escala, na indústria de alimentos, para produção de flavorizantes usado principalmente em bebidas, na maturação de queijos e no processo de panificação, ajudando a prolongar a validade dos pães, promover maciez e textura dos produtos assados (FERNANDES, 2018). Outras aplicações concentram-se na indústria de papel e celulose, usadas como agente de destintagem ou atuam no controle de “pitch”. Na produção de detergentes, são utilizadas como agente de decomposição de ácidos graxos (LI *et al.*, 2012). Atuam ainda como agente umectante na produção de cosméticos. Além disso, muitos estudos relatam o uso de diversas lipases para a produção de biodiesel (ANGAJALA *et al.*, 2016).

Essas enzimas podem ser utilizadas livres no processo ou imobilizadas, entretanto, o seu uso na forma livre apresenta algumas desvantagens de caráter técnico-econômico no processo industrial, como a baixa estabilidade térmica, mecânica e operacional, elevando os custos de produção. Por outro lado, as enzimas imobilizadas comercialmente apresentam custo bem elevado. Diante dessas limitações, pesquisadores têm desenvolvido técnicas avançadas no campo de imobilização, oferecendo muitas vantagens para o processo, como por exemplo, maior atividade, menor custo de produção, melhor estabilidade estrutural, facilidade de separação, recuperação e reutilização do biocatalisador (LIU *et al.*, 2018). Além disso, estudos mostram que a imobilização de enzimas livres em suportes inorgânicos ou lignocelulósicos, associado a uma técnica de pré-tratamento, podem ser bem competitivo (BRÍGIDA, 2010; MONHEMI & HOUSAINDOKHT, 2016; EISENMENGER & REYES-DE-CORCUERA, 2009).

De todos os pré-tratamentos apresentados na literatura, o uso de fluidos supercríticos tem se mostrado superior as técnicas usando solventes orgânicos e líquidos iônicos, pois apresentam vantagens relacionadas às propriedades de transporte, como alta difusividade e baixa viscosidade, que podem potencializar a transferência de substratos para os sítios ativos das enzimas, muitas vezes inacessíveis aos líquidos convencionais (CAO & MATSUDA, 2015). Além disso, essa técnica promove uma fácil eliminação do solvente, através da descompressão. Entre os fluidos supercríticos, o dióxido de carbono é o mais utilizado por ser seguro, inerte ao processo, ter baixo custo e apresentar propriedades críticas moderadas (DIAS *et al.*, 2018).

Isto posto, o objetivo geral desse trabalho consistiu em avaliar os efeitos do CO₂ em condições supercríticas como pré-tratamento da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada. Para isto, a lipase de *T. lanuginosus* foi imobilizada em Amberlite IR 120 Na⁺ e

Amberlite IRA 400 Cl⁻ pelo método de adsorção por ligação iônica. Em seguida, a enzima imobilizada foi submetida ao processo de pré-tratamento utilizando o CO₂ supercrítico, a fim de avaliar os efeitos de temperatura, pressão e tempo de exposição na atividade hidrolítica e na estabilidade, além de estudar as possíveis mudanças estruturais e morfológicas no complexo enzima-suporte. Para fins comparativos, a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada comercialmente (Lipozyme TL IM) fornecida pela Novozymes, também foi exposta a etapa de pré-tratamento visando confrontar os resultados obtidos.

Assim, esta dissertação está dividida em seis capítulos. A revisão bibliográfica tratada no capítulo dois, aborda assuntos como, lipases – um subgrupo das enzimas, especificamente a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, os métodos de imobilização e as técnicas de pré-tratamento de enzimas. No terceiro capítulo são apresentados todos os materiais utilizados e a metodologia adotada para a realização dos ensaios, bem como, a descrição do planejamento de experimentos. Os resultados obtidos a partir da metodologia estudada e a conclusão final da pesquisa são exibidos e discutidos nos capítulos quatro e cinco, respectivamente. O capítulo seis finaliza com sugestões para trabalhos futuros mantendo a mesma linha de pesquisa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse capítulo são apresentadas referências relacionadas ao tema dessa dissertação, iniciando por uma breve introdução sobre as enzimas hidrolases, e mais especificamente a lipase de *Thermomyces lanuginosus* e suas aplicações, os métodos de imobilização enzimática e as técnicas usadas como pré-tratamento visando uma superativação e alta estabilidade dessas enzimas imobilizadas.

2.1. Enzimas

As enzimas são consideradas biocatalisadores que, analogamente aos catalisadores inorgânicos, tem a finalidade de acelerar uma reação através da redução da energia de ativação, sem que as mesmas sejam consumidas durante este processo (VARANDAS *et al.*, 2018). Elas possuem alta especificidade, podendo atuar sobre um único substrato ou até mesmo um conjunto destes, contanto que apresentem características químicas em comum. Outra particularidade, que tem chamado bastante atenção na busca de enzimas para aplicações industriais é a seletividade para o substrato: a enantioseletividade (preferência por um ou outro enantiômero), a regioseletividade (preferência por um entre vários grupos funcionais idênticos na molécula do substrato) e a quimioseletividade (favorecimento de um determinado grupo funcional do substrato) (BADGUJAR & BHANAGE, 2015; SHARMA & KANWAR, 2014).

As enzimas hidrolíticas estão entre os biocatalisadores comerciais mais representativos, devido à sua ampla disponibilidade e especificidade, baixo custo e uso em condições moderadas. As pioneiras são as proteases, lipases e amilases, por terem um papel importante na aplicação industrial (DUMORNÉ *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2015). De todas as enzimas, as lipases foram a mais documentadas e exploradas tanto à pressão ambiente quanto às altas pressões, além de constituir o mais importante grupo de biocatalisadores para síntese de biopolímeros e biodiesel, síntese de peptídeos, acilação regioseletiva de glicóis e mentóis, presente também nas formulações de fármacos, cosméticos, agrotóxicos, produtos de limpeza, em diversos produtos alimentícios e nas indústrias de papel e celulose (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; SHARMA *et al.*, 2001).

2.2. Lipases

As lipases são enzimas capazes de catalisar uma série de reações, incluindo a transesterificação, esterificação, hidrólise de triacilgliceróis insolúveis gerando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (FAN & QIAN, 2010). São encontradas em plantas, tecido animal e micro-organismos. Todavia, as lipases de fontes microbianas têm atraído muita atenção das indústrias, devido à facilidade na manipulação genética e rápido crescimento em meios de baixo custo que permitem maiores rendimentos de produção (THAKUR, 2012). Além disso, as lipases derivadas de micro-organismos possuem capacidade funcional em temperaturas extremas, pH e estabilidade em solventes orgânicos (TREICHEL *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2003).

As lipases são classificadas estruturalmente como uma α/β hidrolase; esse grupo é caracterizado pela presença de uma folha β central contendo oito cadeias β paralelas (mostrada na Figura 1 em azul escuro) mutuamente ligados por hidrogênios, atrelados a uma multiplicidade de formas, principalmente através de α -hélices (vermelho), mas também através de folhas β (azul claro).

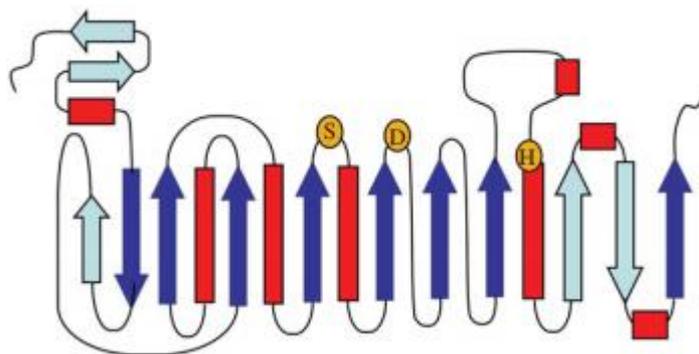


Figura 1 - Exemplo da estrutura da lipase pancreática. Adaptado de REISENBERG *et al.*, 2012.

O sítio ativo das α/β hidrolases consiste numa tríade catalítica altamente conservada: um resíduo nucleofílico (serina - Ser, cisteína - Cys ou ácido aspártico - Asp), um resíduo ácido catalítico (ácido aspártico ou glutâmico - Glu) situado em uma alça reversa localizada após a cadeia $\beta 7$, interagindo com a histidina (His) catalítica por meio de uma ligação de hidrogênio (NARDINI & DIJKSTRA, 1999; HEIKINHEIMO *et al.*, 1999). A histidina é o único resíduo da tríade catalítica que é absolutamente conservada e está localizado em um circuito posicionado após o filamento $\beta 8$. As lipases são o único exemplo de α -hidrolases que possuem um ácido glutâmico na tríade catalítica e o nucleófilo sempre foi caracterizado como um resíduo de serina (UPPENBERG *et al.*, 1994; OLLIS *et al.*, 1992).

Naturalmente, seu sítio ativo é protegido por uma “tampa” móvel, constituída por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica, cuja posição fechada ou aberta determina se a enzima está em sua conformação inativa ou ativa (PLEISS *et al.*, 1998). A mudança conformacional para a posição aberta é realizada através da ligação com o substrato ou na presença de uma superfície hidrofóbica, visto que a enzima reconhece esses suportes como similar aos seus substratos naturais (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991). Esse fenômeno é chamado de ativação interfacial, e é muito utilizado na imobilização das lipases através da adsorção em suportes hidrofóbicos.

A especificidade de cada substrato está relacionada ao tamanho e geometria do sítio ativo da lipase (PLEISS *et al.*, 1998). Todavia, é conhecido que outras regiões proteicas e as condições da reação podem desempenhar um papel na especificidade das lipases (BROCCA *et al.*, 2003). Entretanto, alguns estudos relataram que determinadas lipases, como a lipase de *Pseudomonas sp.* e a lipase de *Myocastor coypu* não sofrem esse fenômeno, mesmo na presença da “tampa” anfifílica (HJORTH *et al.*, 1993; MARTINELLE *et al.*, 1995; THIRSTRUP *et al.*, 1994; CHENG *et al.*, 2012).

2.2.1. Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

O fungo *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente conhecido como *Humicola lanuginosa*) é caracterizado como um termofílico, apresentando crescimento na faixa de 20 a 62 °C, sendo a condição ótima de crescimento entre 40 e 50 °C e pH de 6,5 (EMERSON, 1968). São, frequentemente, isolados de uma variedade de materiais vegetais em decomposição, resíduos orgânicos e esterco de vários pássaros e mamíferos, sendo capaz de crescer utilizando diversos complexos e substratos naturais. São menos frequentes em pastagens secas, solos argilosos e sedimentos aquáticos (KUMAR *et al.*, 2010; SREELATHA *et al.*, 2013).

A partir de 1899, quando foi descoberto pela primeira vez através da inoculação de uma batata, muitos estudos envolvendo diferentes linhagens de *T. lanuginosus* mostraram que são capazes de produzir diversas enzimas extracelulares, como, por exemplo, invertases, amilases, fitases, xilanases, manase, pectinase, lipases, hemicelulases, e que possuem potencial para

aplicações em diversos processos industriais, devido a sua alta estabilidade térmica e ampla faixa de pH (CHAUDHURI *et al.*, 1999; PUCHART *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2009; NGUYEN *et al.*, 2012; MAKOLOMAKWA *et al.*, 2017, REICHARDT *et al.*, 2018).

A lipase de *T. lanuginosus* é uma hidrolase glicosada de alta estabilidade térmica e ativa em uma larga faixa de pH (7 a 12), com pH ótimo de 8. Esse biocatalisador pode ser encontrado comercialmente nas formas solúvel (Lipozyme TL 100 L) e imobilizada (Lipozyme TL IM) ambos da Novozymes Company. Devido à sua versatilidade, tem sido utilizada em diversas áreas industriais, como na síntese de aromas (MARTINS *et al.*, 2013; ANSCHAU *et al.*, 2011), na produção de químicos finos, especialmente na indústria farmacêutica e na composição de cosméticos (LI *et al.*, 2009; FAIGL *et al.*, 2007; PRASAD *et al.*, 2007), na modificação e produção de novos óleos e gorduras (VILLENEUVE *et al.*, 2007; PORSGAARD *et al.*, 2005), na hidrólise de óleos de peixe para produção de ácidos graxos poliinsaturados (LYBERG & ADLERCREUTZ, 2008) e na produção de biodiesel (MUKHERJEE & GUPTA, 2016).

No campo ambiental, podem-se destacar as seguintes aplicações: utilizada juntamente com a lipase de *Candida antactica* na degradação de polímeros (ZHAN *et al.*, 2006; SIVALINGAM & MADRAS, 2004), no tratamento de águas residuais da indústria da carne (RIGO *et al.*, 2008), como um pré-tratamento na etapa de tingimento de lã (KANTOUCH *et al.*, 2005) e na degradação de óleos e graxas através da incorporação da lipase de *T. lanuginosus* em detergentes (JURADO *et al.*, 2007).

Esse biocatalisador apresenta massa molecular de, aproximadamente, 29 kDa e consiste em 269 resíduos de aminoácidos, sendo sete resíduos de lisina (Lis 24, 46, 74, 98, 127, 223 e 237) que são importantes no processo de imobilização por ligação covalente ou cruzada (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) e quatro resíduos de triptofano (Trp 89, 117, 221, 260), dos quais, um Trp 89 está localizado na “tampa” próximo ao sítio ativo, contribuindo para uma catálise eficiente, e os demais resíduos estão relacionados à estabilidade estrutural (ZHU *et al.*, 2001). Seu sítio ativo é composto por uma tríade catalítica comum às lipases, sendo os resíduos a serina (Ser 146), ácido aspártico (Asp 201) e histidina (His 258), conforme mostra a Figura 2 (KUMAR *et al.*, 2015; PRICE *et al.*, 2016).

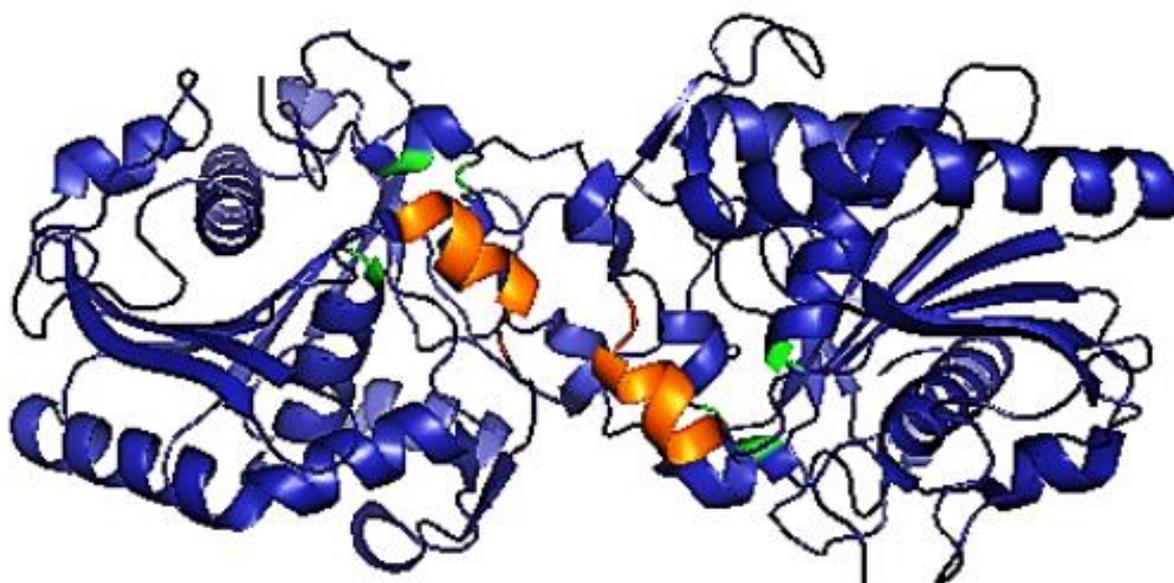


Figura 2 - Estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em sua conformação aberta. Em laranja, a tampa (α -hélice móvel) e, em verde, os resíduos de aminoácidos (Ser 146, Asp 201 e His 258) que compõem o sítio ativo. Fonte: adaptado de FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010.

Sabendo que as enzimas, incluindo as lipases, estão sujeitas à inativação por fatores físicos, químicos ou biológicos ou quando estocadas e/ou durante o uso, muitas técnicas de imobilização têm sido utilizadas com a finalidade de melhorar a estabilidade enzimática garantindo uma catálise eficiente, além de facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

2.3. Métodos de imobilização

Os métodos de imobilização são divididos em físicos ou químicos. Os métodos físicos são caracterizados por interações mais fracas, tais como interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ligação de afinidade, ligação iônica de uma enzima a um material de suporte ou contenção mecânica de uma enzima dentro de um suporte. Nos métodos químicos, a formação de ligações covalentes é feita através de ligações de éter, tioéter, amida ou carbamato entre a enzima e o suporte (BRENDA *et al.*, 2013; CHIOU & WU, 2004).

Ao todo são quatro métodos principais para a imobilização de enzimas: adsorção; encapsulação, que podem ser em redes metalorgânicas, microcápsulas ou matriz, geralmente feito em material polimérico; ligação covalente; e reticulação de moléculas de proteína, sendo esta última realizada através de uma ligação cruzada entre enzima e suporte ou somente entre aglomerados de enzimas, conforme mostra a Figura 3 (LIU *et al.*, 2018; MATIJOSYTE *et al.*, 2010).

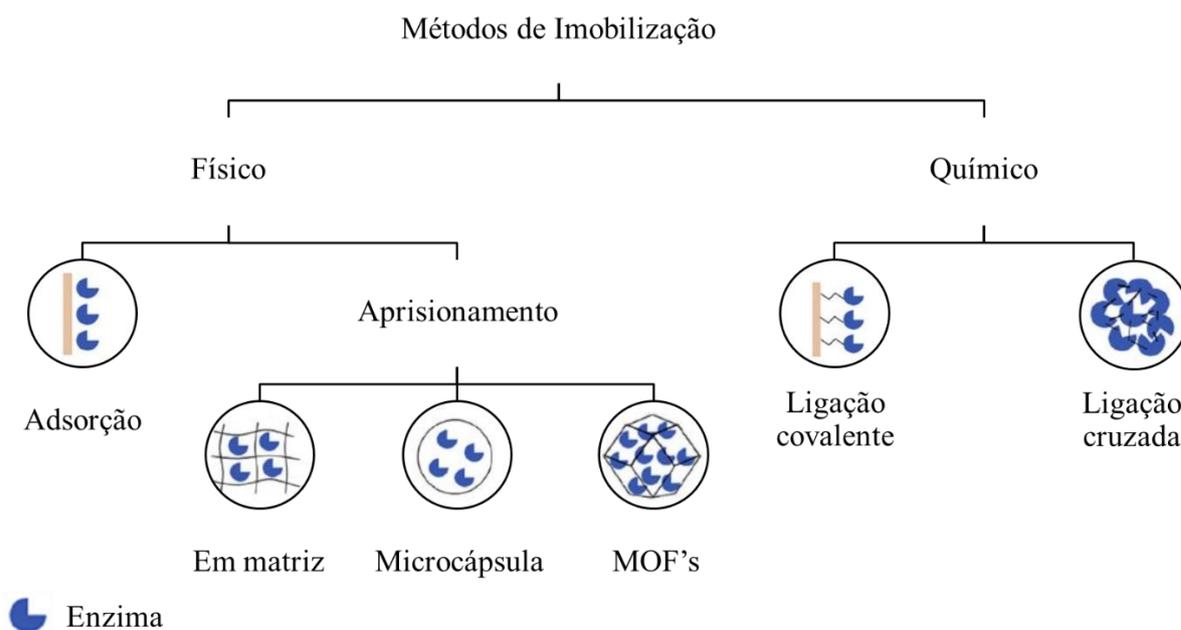


Figura 3 - Métodos de imobilização enzimática. Fonte: Adaptado de Liu *et al.*, 2018.

As interações entre enzima e suporte podem ser classificadas em reversíveis ou irreversíveis. Reversíveis, quando a enzima pode ser desprendida do suporte em condições suaves, sem que a atividade biológica seja alterada (imobilização por adsorção). E irreversíveis (ligação covalente, encapsulação e ligação cruzada) quando o complexo enzima-suporte não sofre alteração em relação a sua ligação (ZHAO *et al.*, 2015).

Cada método de imobilização tem suas próprias vantagens e, inevitavelmente, algumas desvantagens. Entretanto, alguns parâmetros devem ser considerados durante a seleção, como: custo do método de imobilização, atividade global do biocatalisador, estabilidade operacional, propriedades do suporte em relação à fixação da enzima, propriedades hidrodinâmicas,

características de inativação e regeneração e toxicidade dos reagentes utilizados na imobilização (ILLANES *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2011).

As características químicas e físicas do suporte, como a polaridade, a razão molar de grupos hidrofílicos para hidrofóbicos, tamanho de partícula e área de superfície, porosidade e tamanho de poro podem determinar a quantidade de enzimas ligadas. Tipicamente, o suporte poroso é vantajoso, uma vez que o biocatalisador pode ser imobilizado tanto na superfície externa, quanto dentro dos poros do material de suporte (MATTE *et al.*, 2017; MANE *et al.*, 2006).

2.3.1. Adsorção

A técnica de adsorção é a mais empregada no processo de imobilização, cuja enzima é adsorvida espontaneamente à superfície do suporte através interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e ligações iônicas. As etapas consistem na dissolução do biocatalisador e, em seguida, o suporte sólido é colocado em contato com a solução enzimática por um período fixo de tempo. A enzima não adsorvida é então removida por lavagem com tampão. Esta técnica não envolve qualquer funcionalização do suporte e não é destrutiva para a atividade da enzima (JEGANNATHAN *et al.*, 2008; CHOI, 2004).

Ainda que esse método apresente como desvantagem a dessorção das enzimas quando submetidas às variações de temperatura, pH e força iônica, devido à baixa energia de ligação (BRADY & JORDAAN, 2010) a imobilização por adsorção é vantajosa comparada às outras técnicas pelos seguintes aspectos: condições moderadas sem perda importante de atividade, a estrutura conformacional da enzima apresenta baixa alteração, é uma técnica de simples operação, baixo custo, sem necessidade de agente de ligação e fácil recuperação do suporte para imobilização repetidas (TAN *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2012).

2.4. Meios reacionais e técnicas de pré-tratamento

Há um grande interesse industrial em desenvolver biocatalisadores competitivos através de melhorias em sua atividade, estabilidade e capacidade de reutilização. Tais melhorias podem ser realizadas por diferentes preparações na imobilização, modificações química ou genética da enzima nativa (MATEO *et al.*, 2007; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Além disso, encontram-se estudos focados no uso de solventes orgânicos, como n-hexano (ROMERO *et al.*, 2005), fluidos supercríticos, especialmente o dióxido de carbono (KNEZ, 2009) e líquidos iônicos (FEHER *et al.*, 2007) como modificadores no meio reacional.

São inúmeras as vantagens do uso de solventes não aquosos. No entanto, também existem algumas desvantagens, conforme mostra a Tabela 1, que vem sendo mitigadas através de estudos extensivos.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do uso de solventes não aquosos em biocatálise.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none">• Catálise de uma ampla variedade de reações químicas que não são viáveis em meio aquoso;• Facilidade na separação do produto, enzima e solvente;• Aumento da solubilidade de substratos hidrofóbicos em solventes não aquosos hidrofóbicos;	<ul style="list-style-type: none">• Controle da atividade da água necessária para processos envolvendo reações de condensação;• Alto custo na preparação de biocatalisadores imobilizados;• Limitações de transferência de massa no caso de sistemas bifásicos ou solventes viscosos;

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do uso de solventes não aquosos em biocatálise.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none">• Supressão de reações secundárias dependentes da água;• Melhoria e controle das quimio-, regio- e estereoseletividade;• Recuperação e reutilização da enzima mesmo sem imobilização;• Melhoramento da termoestabilidade do biocatalisador em sistema quase anidro;• Eliminação de contaminação microbiana.	<ul style="list-style-type: none">• Inativação de enzimas.

Fonte: Adaptado de CAO & MATSUDA, 2015.

2.4.1. Solventes orgânicos

Muitos substratos e produtos de reações enzimáticas possuem baixa solubilidade em água, dificultando o emprego de reações biocatalisadas em fase aquosa (RICH *et al.*, 2002). Com o objetivo de superar essa barreira, os solventes orgânicos, principalmente o n-hexano, éter isopropílico e dimetilsulfóxido (DMSO), foram os primeiros a serem largamente empregados em biocatálise (KLIBANOV, 1987; SELLEK & CHAUFHURI, 1999; GOTTOR, 2002). Esses solventes proporcionam uma melhor esterificação, ou seja, taxas de conversão mais elevadas e maior estabilidade, preservando a atividade catalítica sem perturbar a monocamada aquosa da enzima (KRISHNA *et al.*, 2001).

O efeito do aumento da taxa de conversão para as lipases é explicado pelo fenômeno de abertura da “tampa” que cobre o sítio ativo da lipase, ou seja, o local de ligação do substrato. Como somente as lipases possuem essa tampa, ao colocá-la em contato com um solvente hidrofóbico, como n-hexano, a tampa é aberta permitindo o livre acesso ao substrato (NAKAMURA *et al.*, 1991). Entretanto, a estabilidade do biocatalisador pode ser afetada dependendo do tipo de solvente não aquoso; isso porque quando a água é completamente removida da superfície da enzima para o meio, alterando os padrões de ligação de hidrogênio, sua estrutura se torna comprometida acarretando na desativação da enzima. Por outro lado, se a ligação de hidrogênio da água é substituída por ligações de hidrogênio de outros solventes, a estrutura proteica da enzima pode se manter ativa (CAO & MATSUDA, 2015; ZAKS & KLIBANOV, 1988).

A intensa busca de solventes sustentáveis e ecologicamente corretos, os chamados solventes verdes, como os líquidos iônicos e fluidos supercríticos tem sido feita devido aos efeitos diversos à saúde humana e ao meio ambiente de alguns solventes orgânicos.

2.4.2. Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos são sais formados inteiramente por pares de íons que, abaixo de 100 °C, permanecem no estado líquido. Eles são uma alternativa aos solventes orgânicos voláteis convencionais, tendo um crescimento exponencial na exploração como meio de reação para biocatálise, devido a sua alta estabilidade térmica e pressão de vapor muito baixa (SONG, 2004; CAO & MATSUDA, 2015). Além de apresentar flexibilidade com relação às suas propriedades físicas (densidade, viscosidade, ponto de fusão, polaridade), que podem ser reguladas com a seleção apropriada de ânions e cátions, esses sais podem ser projetados para serem miscíveis

ou imiscíveis em água ou solventes orgânicos, como por exemplo, hexano, tolueno, éter, 1-propanol (DUPONT *et al.*, 2002).

A literatura apresenta uma ampla gama de abordagens sobre a cinética de reações enzimáticas com altas taxas de conversões, especialmente utilizando lipases, bem como o elevado nível de atividade e melhores estabilidades enzimáticas envolvendo a aplicação de líquidos iônicos (LOZANO *et al.*, 2001; ECKSTEIN *et al.*, 2002; DE DIEGO *et al.*, 2005). Entretanto, o seu uso em escala comercial ainda é reduzido em virtude dos custos elevados da produção dos líquidos iônicos. Mais ainda, os líquidos iônicos podem apresentar alguns níveis de toxicidade que dependem da estrutura e natureza dos íons (EARLE *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010).

2.4.3. Fluidos supercríticos

Os fluidos supercríticos estão em um estado em que a temperatura e pressão estão acima do seu ponto crítico (T_c e P_c). Na Figura 4, é possível observar que acima da temperatura crítica, a forma gasosa da substância não pode ser liquefeita por maior que seja a pressão aplicada; esse fenômeno é explicado devido aos movimentos moleculares intensos, que impedem um balanço positivo favorável à atração intermolecular necessária para formação de um líquido (SMITH *et al.*, 2007).

Nessas condições, esses fluidos conseguem aliar as propriedades de um líquido (densidade e condutividade térmica elevadas) com as propriedades de um gás (viscosidade e tensão superficial baixa e elevada difusividade) aumentando as taxas de transferência de massa de substratos para sítios ativos de enzimas (KNEZ, 2018). São inúmeras as vantagens de seu uso, como a solubilização de compostos hidrofóbicos, possibilidade de realizar reações que são termodinamicamente desfavoráveis em água, bom controle de seletividade, elevadas taxas de reação, possibilidade de um processo integrado de reação e separação a jusante dos produtos, substratos não reagidos e enzima sem qualquer vestígio de solvente, sendo este, eliminado por meio de uma simples descompressão (KNEZ, 2018; TAO *et al.*, 2013; CERNIA & PALOCCI, 1997).

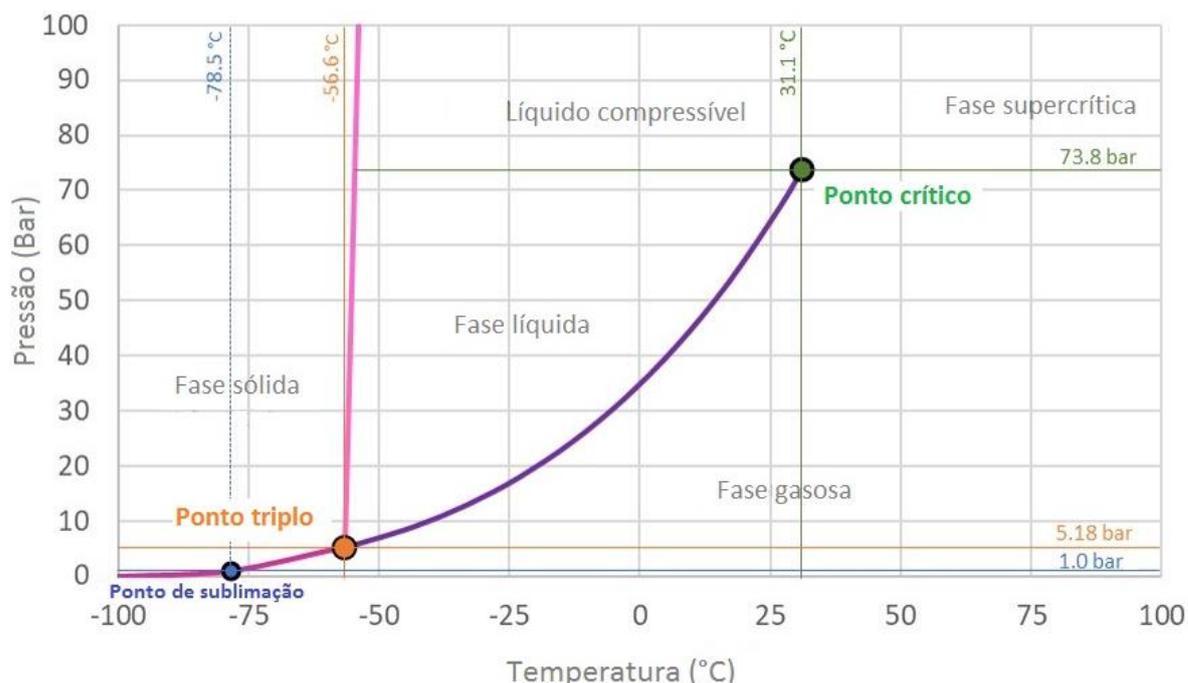


Figura 4 - Diagrama de fases do dióxido de carbono. Adaptado de Engineering toolbox, 2018.

Em biocatálise, a estabilidade e atividade do biocatalisador são parâmetros críticos, sendo assim, é de relevada importância determinar os fatores que os afetam, como atividade de água na enzima, meio reacional e condições operacionais (KNEZ, 2009). Os meios supercríticos, onde a temperatura e a pressão são elevadas, podem ocasionar a desnaturação e, conseqüentemente, a inativação enzimática. Além disso, outro fator limitante é o número de ciclos de pressurização e despressurização, uma vez que a atividade enzimática diminui com o aumento do mesmo (BAUER *et al.*, 2000), sendo necessário o desenvolvimento de estratégias para estabilização enzimática, como por exemplo, o uso de suportes revestidos de polímeros hidrofílicos durante a etapa de imobilização (LOZANO, 2004).

As temperaturas críticas da maioria dos fluidos supercríticos utilizados em biocatálise estão próximas daquelas de maior estabilidade e atividade das enzimas. Em contrapartida, a água supercrítica ($P_c = 221$ bar e $T_c = 374$ °C) não pode ser usada nesse tipo de processo, visto que, sob altas temperaturas, as enzimas são completamente inativadas (WEINGÄRTNER & FRANCK, 2005). Na Tabela 2 destacam-se os fluidos supercríticos mais adequados para a biocatálise, ou seja, que apresentam valores de temperatura crítica entre 35 °C e 50 °C e valores de pressão crítica abaixo dos 100 bar.

Tabela 2 - Temperatura e pressão crítica de alguns fluidos usado em biocatálise.

Fluido	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (Bar)
Dióxido de carbono	31,1	73,8
Etano	32,3	48,8
Hexafluoreto de enxofre	45,6	37,6
Fluorofórmio	25,9	48,8

Adaptado de Garcia, 2005.

Dentre esses, o dióxido de carbono (CO₂) se destaca por possuir baixo custo, estar prontamente disponível em alta pureza, ser seguro de manusear, inerte e por ser considerado ambientalmente correto, comparado com outros solventes. Além disso, sua alta volatilidade permite que seja completamente e facilmente removido do processo (BRUNNER, 2005; SANTOS *et al.*, 2016). Há muitos relatos na literatura sobre o uso de fluidos supercrítico em biocatálise, especialmente com relação ao dióxido de carbono como meio reacional. Entretanto, foi no final da década de 90 que pesquisadores descreveram o seu uso como um método de pré-tratamento buscando avaliar possíveis alterações estruturais em diversos biocatalisadores.

Kao *et al.* (1997) avaliaram o hexafluoreto de enxofre (SF₆), um fluido supercrítico alternativo ao CO₂, como um solvente potencial para melhorar a atividade da lipase de *Candida rugosa* tipo VII. As condições operacionais estudadas foram temperatura (20 a 60 °C), pressão (42 a 415 bar) e tempo de exposição (10 a 50 h). Foi observado que há uma relação inversa do tempo de exposição ao SF₆ com a atividade residual, resultando em até 10% de perda. Todavia, quando a enzima foi exposta ao CO₂-SC, a perda de atividade residual foi maior 20%. Isso leva à conclusão de que o SF₆ supercrítico tem comportamento semelhante ao de um solvente orgânico hidrofóbico em termos de desnaturação enzimática e é melhor que o CO₂ supercrítico.

Giessauf *et al.* (1999) investigaram os fatores que causam a inativação das enzimas através da interação entre as proteínas e o fluido supercrítico. Para isto, foram utilizadas as lipases de *C. rugosa* (Lipase AY 30), lipase de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS), lipase de *Aspergillus niger* e a lipase de *Candida cylindracea*. Todos os experimentos foram conduzidos em 30 ciclos de pressurização/despressurização, 150 bar de pressão, 75 °C de temperatura e 45 min de exposição ao SC-CO₂. Para as lipases de *A. niger* e *C. cylindracea* não houve alteração

da atividade residual, enquanto que as lipases de *C. rugosa* e *B. cepacia* obtiveram uma redução em até 30 % da atividade inicial. As etapas de pressurização/despressurização têm um impacto negativo considerando uma enzima que possuem pontes dissulfetos em sua estrutura contribuindo com uma desnaturação.

Aucoin & Legge (2001) propuseram um delineamento experimental de dois níveis para quantificar a influência do tempo de exposição ao CO₂-SC, ciclo de pressurização/despressurização e da taxa de depressurização sobre a atividade residual da lipase de *Rhizomucor Miehei* imobilizada comercialmente, em uma resina macroporosa de troca aniônica (Lipozyme IM20 da Novo Nordisk). Neste experimento, as condições de temperatura e pressão foram fixadas em 35-37 °C e 86-89 bar, respectivamente. Os três níveis de ciclos de pressurização/despressurização correspondem a 1, 3 e 5 ciclos. Os três níveis de taxas de depressurização foram de 86-89 bar/min (despressurizando o reator em 1 min); 8,6-8,9 bar/min (despressurizando o reator em 10 min) e 4,3-4,45 bar/min (despressurizando o reator em 20 min). Os três níveis de exposição correspondem a 4, 8 e 12 h. A menor atividade residual foi observada em corridas em que a taxa de depressurização foi de 86 a 89 bar/min. O tempo de exposição de 12 h também produziu baixa atividade residual, mas apenas ao expor a enzima imobilizada a um ciclo de pressurização/despressurização. A maior atividade residual foi obtida para enzimas imobilizadas repetidamente expostas por um período de 12 h e 5 ciclos de pressurização/despressurização, com uma taxa de depressurização de 4,3 a 4,45 bar/min. Observou-se que todos os três parâmetros investigados afetam a atividade residual da enzima. E que o aumento da atividade possa ser devido à extração de componentes inibidores na matriz de imobilização. Quantitativamente, a taxa de depressurização tem um efeito negativo sobre a atividade residual e é benéfico depressurizar a uma taxa menor que 8,9 bar min⁻¹.

Lanza *et al.* (2004) adotaram um planejamento experimental de dois níveis e quatro fatores, com temperatura (40-70 °C), pressão (80-255,5 bar), tempo de exposição ao CO₂-SC (1-6 h), densidade reduzida (0,6-1,6) e taxa de descompressão (10-200 kg/m³.min), com o objetivo de avaliar a influência desses fatores sobre a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina macroporosa aniônica, comercialmente conhecida como Novozym 435. Foi observado que, em todas as condições experimentais, a perda de atividade enzimática foi menor que 15%, estando associada ao aumento na temperatura e densidade relativa, sendo esses efeitos os mais significativos, conforme o estudo estatístico mostrado pelo autor.

Celia *et al.* (2005) estudaram o efeito da pressão e da temperatura, em condições supercríticas do CO₂ e do SF₆, sobre a atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL), imobilizada em sílica gel. Para ambos os fluidos, as condições de temperatura e tempo de exposição foram constantes, 50 °C e 6 h, respectivamente, mas variou a pressão entre 150 a 250 bar para o CO₂-SC e 100 a 150 bar para o SF₆-SC. Os resultados mostraram uma recuperação da atividade enzimática de até 89% após a incubação no meio supercrítico. O uso do SF₆ supercrítico como meio reacional estabiliza a estrutura da enzima e mantém o equilíbrio de repartição eficaz de reagentes e produtos, quando comparado com o CO₂-SC. Além disso, os autores sugeriram que a ativação do PCL também poderia estar associada à estabilização, por interações hidrofóbicas, da forma lipase “aberta”. Em tal condição, a tampa é afastada e as moléculas hidrofóbicas de SF₆ se espalham pelo local ativo, após a abertura da tampa, desbloqueando a entrada, favorecendo a reação do reagente ao sítio ativo da lipase.

Oliveira *et al.* (2006) investigaram a influência da temperatura, pressão, tempo de exposição e taxa de depressurização na atividade de duas lipases imobilizadas comercialmente, lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme IM) e a lipase de *Candida antarctica*, ambas imobilizadas em uma resina aniônica macroporosa (Novozym 435), submetidas ao CO₂ comprimido, propano e n-butano. Os experimentos foram conduzidos na temperatura de 35 a 75 °C e tempo de exposição de 1 a 6 h para todas as enzimas e solventes. Para o CO₂, a pressão variou de 71,5 a 276 bar, enquanto que, para o propano de 30 a 250 bar e para o n-butano de 10 a 250 bar. Foi

observado que houve perda de atividade em relação a Lipozyme IM em todas as condições operacionais para todos os solventes comprimidos, principalmente em CO₂, onde a perda máxima foi de 14% na condição de 35 °C, 6 h e 71,5 bar. Para a Novozym 435, o uso de propano e n-butano promoveu melhorias na atividade, 14% e 22 %, respectivamente, ambos nas condições de 75 °C, 250 bar e 6 h. Entretanto, o uso de CO₂-SC ocasionou na perda de atividade (9%) nas condições de 75 °C, 6 h e 200 bar. Em geral, dentro da faixa estudada, a temperatura e os tempos de exposição afetaram positivamente a atividade enzimática, enquanto as taxas de descompressão não demonstraram ser uma variável relevante. Além disso, foi realizado um estudo exploratório para investigar o efeito dos ciclos de compressão/expansão na atividade enzimática em todos os solventes. Análises termogravimétricas mostram que os perfis térmicos de Novozym 435 tratados em n-butano e dióxido de carbono são semelhantes à enzima não tratada. Micrografias eletrônicas de varredura de Novozym 435 mostram que o material submetido ao dióxido de carbono apresentou alterações morfológicas quando comparado à enzima não tratada.

Liu *et al.* (2012) avaliaram os efeitos causados pela pressão (60 e 100 bar), tempo de exposição (30 e 150 min) e temperatura (35 e 40 °C) sobre a estrutura e atividade hidrolítica da lipase de *Candida rugosa* – CRL, na presença do dióxido de carbono subcrítico e supercrítico. Foi observado uma superativação do biocatalisador utilizado em todas as condições experimentais, sendo o máximo registrado em 188% nas condições de 100 bar, 40 °C e 30 min. Os autores postularam ainda que o aumento dessa atividade foi devido à alteração na estrutura secundária e terciária da CRL. No ano seguinte, um estudo com a lipase de *Candida antarctica* (CALB da Novo Norvisk) e a lipase de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS da Amano Pharmaceutical) foi desenvolvido pelos mesmos autores, sob as mesmas condições experimentais relatadas acima. Foi observado um aumento na atividade para ambas as lipases após o tratamento com CO₂ subcrítico e supercrítico. O maior aumento na atividade observado para a CALB foi de 105% e para a Lipase PS foi de 116%. Ambos os aumentos foram mantidos nas condições de 100 bar, 40 °C e 30 min. Entretanto, na condição de 100 bar, 40 °C e 150 min, houve uma redução na atividade residual em 18% para a CALB. O CO₂-SC teve efeitos insignificantes nas estruturas primárias CALB e lipase PS; no entanto, esse tratamento alterou as estruturas secundária e terciária das proteínas, alterando significativamente a atividade catalítica dessas enzimas quando comparadas com as amostras não tratadas (Liu *et al.*, 2013).

Chen *et al.* (2013a) analisaram o comportamento de três lipases em sua forma livre (Lipase de *Candida rugosa* – CRL, Lipase de *Rhizopus oryzae* – ROL, Lipase de *Pseudomonas fluorescens* – PFL) sob dióxido de carbono sub e supercrítico. Para isto, foram realizados dois planejamentos experimentais de dois níveis e três fatores. As condições de temperatura foram de 35 a 45 °C, tempo de exposição de 10 a 40 min, mantendo constante a taxa de pressurização (50 bar/min) e de despressurização (40 bar/min), para ambos os estados. A pressão variou de 50 a 70 bar para o estado subcrítico e de 100 a 200 bar para o estado supercrítico. Foi observado que a atividade da CRL aumentou após o tratamento com CO₂ subcrítico (109–122%), enquanto que, no estado supercrítico, a atividade aumentou ligeiramente em até 110% e que a menor atividade foi de 93%. Já para a PFL, foi observado um aumento significativo na atividade em todas as condições experimentais; o maior aumento foi de 146% no estado subcrítico e 163% no estado supercrítico. No tratamento da ROL em condições subcríticas, a atividade aumentou, em no máximo 154%, exceto na condição de 70 bar, 45 °C e 10 min, que foi de 77%. A atividade após o tratamento no fluido supercrítico aumentou significativamente, (209%), sendo esta, na condição de 150 bar, 40 °C e 25 min de exposição ao CO₂-SC. Os autores concluíram que a pressão afetou negativamente a atividade da CRL e o tempo de exposição afetou positivamente a atividade da PFL no tratamento com o CO₂ supercrítico. Além disso, uma taxa leve de despressurização pode proteger a estrutura rígida da lipase sob fluido supercrítico contribuindo com uma melhora da atividade e estabilidade.

No mesmo ano, Chen *et al.* (2013b) realizaram o mesmo estudo, mantendo as mesmas condições citadas acima, entretanto utilizando a Lipase de *Pseudomonas cepacia* – PCL. Percebeu-se um aumento na atividade após o tratamento com CO₂ subcrítico para a maioria das condições experimentais investigadas, e o maior aumento foi de 126%. Já no estado supercrítico, a atividade aumentou em até 130%, sendo esta, na condição de 150 bar, 40 °C e 25 min de exposição ao CO₂-SC. O tratamento com a alta pressão beneficiou a atividade de esterificação do PCL, bem como o tempo de exposição que teve um efeito positivo após o tratamento com o dióxido de carbono supercrítico.

Carvalho *et al.* (2014) avaliaram o efeito da pressão (50 e 200 bar), temperatura (45 e 60 °C) e tempo de exposição (1 a 6 h) sobre a estabilidade e atividade residual da lipase de *Bacillus sp.* (ITP-001), em sua forma livre e imobilizada em sílica gel. A atividade hidrolítica da lipase livre permaneceu constante até 6 h de exposição a 60 °C e 200 bar, com um ganho de 15% em relação a atividade inicial. Enquanto que, para a enzima imobilizada, foi observado um efeito inverso, ou seja, um decréscimo da atividade hidrolítica, aproximadamente 70% em relação a atividade inicial. Os autores verificaram que a temperatura tem um efeito negativo sobre a atividade residual da lipase de *Bacillus sp.*

Melgosa *et al.* (2015) estudaram a influência da temperatura, pressão, tempo de exposição e despressurização na atividade de quatro lipases comerciais após o tratamento com CO₂ supercrítico: duas na forma livre; sendo elas a lipase de *Rhizomucor miehei* expressa em *Aspergillus oryzae* (Palatase 20000 L) e a lipase de *Candida antarctica* expressa em *Aspergillus niger* (Lipozyme CALB L), e duas na forma imobilizadas; a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em Duolite A568, resina de troca aniônica de base fraca granulada hidrofílica macroporosa (Lipozyme RM IM) e a lipase de *Candida antarctica* expressa em *Aspergillus niger* adsorvida em Lewatit VP OC 1600, resina hidrofóbica macroporosa (Lipozyme 435). Os experimentos foram conduzidos na pressão de 100 a 250 bar, temperatura de 35 a 70 °C, tempo de exposição de 1 a 3 h e despressurização de 1 a 3 ciclos. Em todos os experimentos realizados, observou-se que o tratamento com CO₂-SC ocasionou em perdas de atividade, com exceção da Lipozyme RM IM que, na condição de 100 bar, 50 °C, 3 h e 1 ciclo de despressurização, nenhum efeito significativo foi observado.

Dos Santos *et al.* (2016) avaliaram a atividade da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em uma resina aniônica macroporosa (Lipozyme 435) em processos com CO₂ supercrítico como meio de reação. Os efeitos avaliados foram a temperatura (40 a 60 °C), pressão (100 a 200 bar), tempo de exposição (1 a 6 h) e despressurização (1 a 3 ciclos). Foi observado que, em todas as condições, a atividade da Lipozyme 435 diminuiu, sendo a maior redução de 68% na condição de 40 °C, 200 bar, 6 h e 3 ciclos de despressurização. O número de ciclos de pressurização e despressurização influenciou negativamente sobre a atividade residual. Além disso o CO₂-SC não influenciou na estrutura do suporte.

Os estudos mostram que o fluido supercrítico pode ser um aliado a biocatálise, promovendo o aumento da atividade enzimática. A Tabela 3 mostra sintetiza os intervalos de temperatura, pressão e tempo de exposição explorado na literatura com a finalidade de avaliar a atividade e a estabilidade de diversas enzimas.

Tabela 3 - Síntese das condições operacionais estudadas para pré-tratar enzimas em meios supercríticos.

Enzima	P (bar)	T (°C)	t (h)	At. Res. (%)	Referência
Lipozyme 435 (Lipase de <i>C. antarctica</i>)	100 a 200	40 a 60	1 a 6	90,3	Santos <i>et al.</i> , 2016
Lipozyme 435 (Lipase de <i>C. antarctica</i>)	100 a 250	35 a 70	1 a 6	97	Melgosa <i>et al.</i> , 2015
Lipozyme CALB L (Lipase de <i>C. antarctica</i>)	100 a 250	35 a 70	1 a 6	97	Melgosa <i>et al.</i> , 2015
Palatase 20000 L (Lipase de <i>R. miehei</i>)	100 a 250	35 a 70	1 a 6	97	Melgosa <i>et al.</i> , 2015
Lipozyme RM IM (Lipase de <i>R. miehei</i>)	100 a 250	35 a 70	1 a 6	97	Melgosa <i>et al.</i> , 2015
Lipase de <i>Bacillus sp.</i> Livre	50 e 200	45 e 60	1 a 6	115	Carvalho <i>et al.</i> , 2014
Lipase de <i>Bacillus sp.</i> Imobilizada	50 e 200	45 e 60	1 a 6	70	Carvalho <i>et al.</i> , 2014
Lipase de <i>C. rugosa</i>	100 a 200	35 a 45	0,17 a 0,67	110	Chen <i>et al.</i> , 2013a
Lipase de <i>R. oryzae</i>	100 a 200	35 a 45	0,17 a 0,67	163	Chen <i>et al.</i> , 2013a
Lipase de <i>P. fluorescens</i>	100 a 200	35 a 45	0,17 a 0,67	204	Chen <i>et al.</i> , 2013a
Lipase de <i>P. cepacia</i>	100 a 200	35 a 45	0,17 a 0,67	130	Chen <i>et al.</i> , 2013b
Lipase PS (Lipase de <i>B. cepacia</i>)	100	40	0,5 a 2,5	116	Liu <i>et al.</i> , 2013
CALB (Lipase de <i>C. antarctica</i>)	100	40	0,5 a 2,5	105	Liu <i>et al.</i> , 2013
Lipase de <i>C. rugosa</i>	100	40	0,5 a 2,5	188	Liu <i>et al.</i> , 2012
Novozym 435 (Lipase de <i>C. antarctica</i>)	71,5 a 276	35 a 75	1 a 6	91	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
Lipozyme IM (Lipase de <i>M. miehei</i>)	71,5 a 276	35 a 75	1 a 6	86	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
Lipase de <i>P. cepacia</i>	100 a 250	50	6	89	Celia <i>et al.</i> , 2005
Novozym 435 (Lipase de <i>C. antarctica</i>)	80 a 256	40 a 70	1 a 6	85	Lanza <i>et al.</i> , 2004
Lipozyme IM20 (Lipase de <i>R. Mieihei</i>)	86 a 89	35 a 37	4 a 12	Não informado	Aucoin & Legge, 2001
Lipase AY 30 (Lipases de <i>C. rugosa</i>)	150	75	0,75	72	Giessauf <i>et al.</i> , 1999
Lipase PS (Lipase de <i>B. cepacia</i>)	150	75	0,75	70	Giessauf <i>et al.</i> , 1999
Lipase de <i>A. niger</i>	150	75	0,75	100	Giessauf <i>et al.</i> , 1999
Lipase de <i>C. cylindracea</i>	150	75	0,75	100	Giessauf <i>et al.</i> , 1999
Lipase de <i>C. rugosa</i> VII	42 a 415	20 a 60	10 a 50	90	Kao <i>et al.</i> , 1997

2.5. Considerações sobre a revisão bibliográfica

De acordo com os trabalhos anteriormente citados, até o presente momento, não há relatos na literatura de pesquisas utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* com o CO₂ supercrítico como pré-tratamento.

Em relação aos suportes, somente um trabalho utilizou o suporte Amberlite IR120 Na⁺ para imobilização de lipase de *Acinetobacter calcoaceticus*, todavia, a enzima não foi pré-tratada. Além disso, foram encontrados dois artigos que utilizaram Amberlite IR120 Na⁺ e Amberlite IRA400 Cl⁻ para imobilizar isomerases e lacases.

Dentre todos os métodos de imobilização apresentados, escolheu-se a imobilização por adsorção por ser uma técnica de baixo custo e de simples operação. Enquanto que a escolha pelo fluido supercrítico em oposição aos solventes orgânicos e líquidos iônicos, se deve ao fato da disponibilidade do CO₂ e estrutura para a realização do pré-tratamento. Mais ainda, por não ser prejudicial à saúde humana e à natureza, além da facilidade da recuperação da enzima imobilizada, ou seja, sistema livre de solvente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

São apresentados neste capítulo todos os materiais e a metodologia utilizados para a elaboração desta dissertação. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (LTAB), localizado no Departamento de Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A enzima pré-tratada foi submetida às análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) realizadas na Central Analítica do Departamento de Química da UFRRJ, enquanto que as análises de determinação de teor de proteína e calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas na Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro – RJ) e na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza – CE), respectivamente.

3.1. Materiais

Para este estudo, foi utilizada a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), imobilizada comercialmente (Lipozyme TL IM, Lote LA331092) e na sua forma solúvel (Lipozyme TL 100 L, Lote LAP 40097), ambas cedidas pela Novozymes Latin America Ltda. Suas propriedades e condições ótimas de temperatura e pH estão destacadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Descrição e condições ótimas de uso da lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus*.

Propriedades	Lipozyme TL IM	Lipozyme TL 100 L
Formulação	Imobilizada	Líquida
Atividade ^a	250 IUN/g	100 KLU/g
Teor proteico ^b	0,0982 mg/mg suporte	22,47 mg/ml solução
pH ótimo	6 – 8	7 – 10
Temperatura ótima (°C)	50 – 75	20 – 50
Substrato específico	Ésteres	Ésteres e diésteres

^a K = Quilo, LU = Unidade de Lipase, IUN = Unidade de Interesterificação. 1 LU é a quantidade de atividade enzimática que libera 1 µmol de ácido butírico tritrável do substrato do tributirato de glicerol por minuto sob condições padrão definidas. 1 LU é igual a 1 IUN.

Fonte: Adaptado de Novozymes Company (2016a e 2016b); ^b SIMAS, 2008.

No processo de imobilização das lipases livre, foram empregados dois tipos de suporte inorgânico: Amberlite[®] IRA400 Cl⁻, resina de troca aniônica fortemente básica e Amberlite[®] IR120 Na⁺, resina de troca catiônica fortemente ácida, ambos da The Dow Chemical Company. Principais propriedades dos suportes estão descritas na Tabela 5.

Para o pré-tratamento, utilizou-se o dióxido de carbono adquirido da White Martins Praxair (99,9995 % de pureza mínima). A reação de hidrólise foi realizada utilizando o p-nitrofenil laurato (pNFL) da Sigma Aldrich Company. Foi preparada uma solução tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7) a partir do fosfato de sódio dibásico anidro P.A., adquirido da Vetec Química Fina Ltda e do fosfato de sódio monobásico anidro P.A., obtido da Proquimios Comércio e Indústria. Os demais reagentes usados nos experimentos para o desenvolvimento dessa dissertação, foram: ácido clorídrico P.A., hidróxido de sódio P.A., dimetilsulfóxido P.A., todos adquiridos da Vetec Química Fina Ltda.

Tabela 5 - Principais propriedades físicas e químicas de resinas sintéticas utilizadas como suporte para imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*.

Propriedades	Amberlite IRA400 Cl ⁻	Amberlite IR120 Na ⁺
Tamanho da partícula	600 -750 µm	600 – 800 µm
Reticulação (%)	8	8
Umidade (%)	40 – 47	45 – 50
Matriz	Estireno/divinilbenzeno	Estireno/divinilbenzeno
Grupo ativo matriz	Quaternário de amônio	Ácido sulfônico

Fonte: Adaptado de The Dow Chemical Company (2018) e Rohm and Haas Company (2005).

3.2. Metodologia experimental

As etapas experimentais consistiram na preparação da amostra, iniciado pela ativação do suporte, utilizando uma base para a resina aniônica e um ácido para a resina catiônica, seguida da imobilização da lipase de *T. lanuginosus*, realizada nas condições de 2 h e 40 rpm, através da técnica de adsorção por ligação iônica. O biocatalisador imobilizado seguiu para a etapa de pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico, utilizando um planejamento experimental (Delineamento Fatorial Fracionado - DFF) com uma triplicata no ponto central.

Por fim, realizaram-se as análises de atividade hidrolítica, FTIR (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier), DSC (calorimetria exploratória diferencial) e avaliou-se o efeito da concentração do substrato sobre a atividade TLL. A Figura 5 apresenta o diagrama esquemático das etapas experimentais que serão detalhadas a seguir.

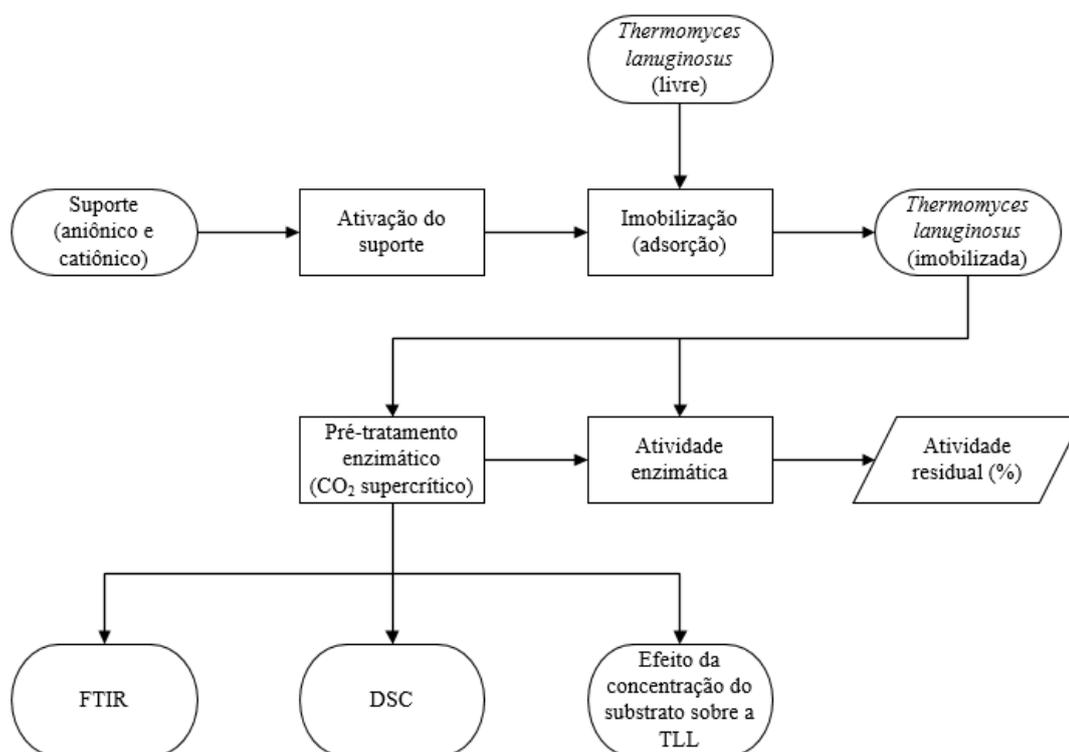


Figura 5 - Diagrama esquemático das etapas experimentais realizadas nesta dissertação.

3.2.1. Ativação do suporte

Para a ativação do suporte, foi colocada a resina catiônica, Amberlite IR 120 Na⁺ form, em contato e, sob agitação, durante 30 minutos, com excesso de solução de HCl 6 mol/L. Em seguida, a resina foi filtrada e lavada exaustivamente com água destilada até que todo o excesso de íons H⁺ fosse removido da superfície da mesma; esta etapa foi monitorada usando um papel indicador universal de pH. Ao final desse processo, a resina ativada foi recolhida em um tubo Falcon, contendo solução tampão de fosfato de sódio a 50 mM (pH 7).



Figura 6 – Procedimento de ativação do suporte Amberlite IR 120 Na⁺ com uma solução de ácido clorídrico.

O mesmo procedimento foi empregado para a resina aniônica, Amberlite IRA 400 chloride form, entretanto usando uma solução alcalina de NaOH 6 mol/L (NOGUEIRA *et al.*, 2014).

3.2.2. Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

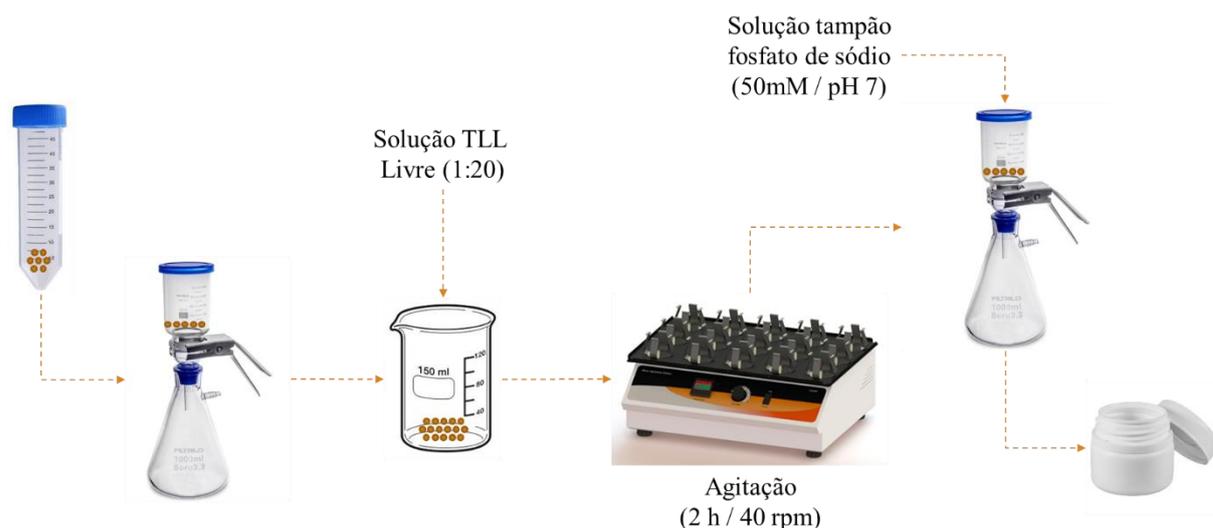


Figura 7 - Procedimento de Imobilizada da TLL através da técnica de adsorção iônica.

Inicialmente, preparou-se uma solução de lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre diluindo a enzima comercial em uma solução tampão de fosfato de sódio a 50 mM (pH 7), em uma proporção 1:20. Em seguida, foi adicionado 10 mL da solução de TLL em 3 g de resina ativada, previamente filtrada a vácuo, o sistema foi mantido sob agitação por duas horas e

40 rpm, aproximadamente. Das amostras do imobilizado e do sobrenadante foram coletadas alíquotas para determinação da atividade hidrolítica em pNFL (item 3.3.1), rendimento de imobilização (item 3.3.2), atividade recuperada (item 3.3.3) e teor de proteína nos sobrenadantes (item 3.3.4). Após 2 h, os derivados foram filtrados e lavados com uma solução tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7). Os derivados obtidos foram estocados a 4 °C.

3.2.3. Pré-tratamento com CO₂ supercrítico

O processo de pré-tratamento foi realizado no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis da UFRRJ, conforme o fluxograma mostrado na Figura 8. A unidade experimental é composta por um compressor e filtro de ar, uma célula de alta pressão com capacidade de 42 mL em aço inoxidável – 316SS, acoplado em um banho termostático (modelo Fisatom) para controlar a temperatura do processo e uma bomba de alta pressão (Palm modelo G100), responsável pela alimentação do solvente (CO₂ e uma válvula micrométrica, para controlar o fluxo de despressurização do sistema.

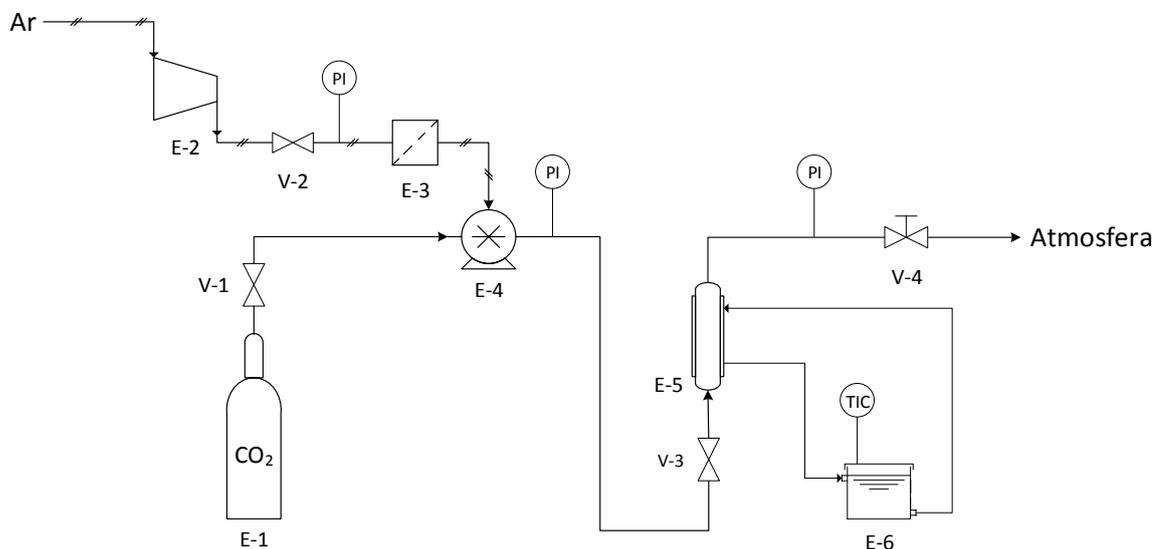


Figura 8 - Fluxograma do processo de pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico. E-1: cilindro de CO₂; E-2: compressor de ar; E-3: filtro de ar; E-4: bomba de alta pressão; E-5: célula de alta pressão; E-6: banho termostático; V-1, V-2, V-3: válvula gaveta; V-4: válvula micrométrica.

O extrator é, primeiramente, alimentado com cerca de 0,5 g de enzima imobilizada, previamente acondicionada em um papel filtro. Logo após o extrator ser alimentado, o processo é iniciado ligando o banho de aquecimento para que o mesmo atinja a temperatura desejada, de acordo com as condições operacionais estabelecidas no processo. Em paralelo, o compressor de ar é acionado transmitindo um sinal pneumático à bomba de alta pressão; esta então é ligada e em seguida, o CO₂ é bombeado ao extrator. Neste momento, após todos os set-points serem atingidos, inicia-se o processo de pré-tratamento. Ao final, a unidade é despressurizada lentamente, garantindo que a vazão de solvente seja mínima, evitando o desdobramento da cadeia de proteína, o que levaria a uma desnaturação e, conseqüentemente, uma perda da atividade enzimática (HU *et al.*, 2013). Após a abertura do extrator, a amostra é recolhida em um tubo Falcon de 10 mL e mantida sob refrigeração. Os ensaios foram realizados seguindo um planejamento de experimentos com o tempo máximo de 6 horas. A partir destes experimentos foram realizadas análises em relação ao suporte e à enzima.

3.2.4. Planejamento experimental

Para este estudo foi adotado um delineamento fatorial fracionário (DFF) de três fatores e dois níveis com triplicata no ponto central, conforme mostra a Tabela 76, buscando avaliar estatisticamente os efeitos principais e/ou de interação entre as variáveis independentes: temperatura, pressão e tempo de exposição sobre uma resposta desejada – atividade hidrolítica residual. A temperatura variou de 35 a 75 °C, a pressão variou de 100 a 300 bar e o tempo de exposição variou de 1 a 6 h. Todas as condições foram definidas de acordo com a revisão bibliográfica apresentada anteriormente.

Tabela 6 - Matriz de planejamento fatorial fracionado aplicada ao pré-tratamento da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada comercialmente (Lipozyme TL IM) e em suporte IR120 Na⁺.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Independentes		
	Temperatura	Pressão	Tempo	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Tempo (h)
1	-1	-1	-1	35	100	1
2	-1	-1	1	35	100	6
3	-1	1	-1	35	300	1
4	-1	1	1	35	300	6
5	1	-1	-1	75	100	1
6	1	-1	1	75	100	6
7	1	1	-1	75	300	1
8	1	1	1	75	300	6
9	0	0	0	55	200	3,5
10	0	0	0	55	200	3,5
11	0	0	0	55	200	3,5

Os efeitos das variáveis e os respectivos erros foram calculados considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Além disso, foi realizada uma análise entre as respostas experimentais e estimada por um modelo preditivo, baseado na análise de variância (ANOVA) com o objetivo de verificar a qualidade do ajuste desse modelo. Em seguida, obteve-se o coeficiente de determinação (R^2), que fornece a variação dos resultados previstos e obtidos e calcularam-se ainda os valores de F do Teste de Fisher para avaliar a significância do modelo. Os intervalos ótimos de cada variável do processo foram definidos adotando uma metodologia de superfície de resposta e curvas de contorno.

Com a finalidade de investigar as variáveis propostas (temperatura, pressão e tempo de exposição) sobre a atividade residual, foi definido outras condições experimentais, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 – Condições experimentais extras aplicada ao pré-tratamento da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Tempo (h)
1	45	135	2,25
2	45	135	4,75
3	45	245	2,25
4	45	245	4,75
5	65	135	2,25
6	65	135	4,75
7	65	245	2,25
8	65	245	4,75
9	55	190	1
10	55	190	6
11	55	80	3,5
12	55	300	3,5
13	35	190	3,5
14	75	190	3,5
15	55	190	3,5
16	55	190	3,5
17	55	190	3,5

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Atividade hidrolítica em p-nitrofenil laurato (pNFL)

Inicialmente, o substrato foi preparado através da dissolução de 18 mg de p-nitrofenil laurato em 1 mL de dimetilsulfóxido, e posteriormente, diluído em 100 mL da solução tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7). Para determinar a atividade hidrolítica da solução de enzima livre, recolheu-se uma alíquota de 1,8 mL de substrato e colocou-se em contato com 0,2 mL de enzima. A reação foi acompanhada através da leitura de absorbância, realizada em um espectrofotômetro UV-Visível (BEL M51), no comprimento de onda de 410 nm, durante os primeiros 100 segundos. O cálculo da atividade da enzima livre foi realizado de acordo com a Equação 3.1.

$$A = \frac{\Delta abs \times f \times V_R}{\Delta t \times v_A} \quad (3.1)$$

Sendo:

A – atividade hidrolítica da enzima (U/mL), na qual a unidade – U de atividade enzimática hidrolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições propostas;

Δabs – variação de absorvância no intervalo de tempo transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorvância;

f – fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol, cujo valor é 109,3 μmol/L para cubeta de vidro;

V_R – volume (L) reacional;

V_A – volume (mL) de enzima utilizada;

Δt – tempo (min) decorrido de análise.

Para a atividade hidrolítica da enzima imobilizada, uma alíquota de 20 mL do substrato foi recolhida e colocada em contato com uma certa quantidade de enzima imobilizada (Tabela 8), sendo o sistema mantido sob agitação por um período de 5 minutos.

Tabela 8 - Massa de enzima imobilizada usada para medição de atividade.

Suporte	Massa (g)
IR 120	0,05
IRA 400	0,02
Comercial	0,0001

O cálculo da atividade da enzima imobilizada foi realizado de acordo com a Equação 3.2.

$$A = \frac{\Delta abs \times f \times V_R}{\Delta t \times M_A} \quad (3.2)$$

Sendo,

A – atividade hidrolítica da enzima (U/g), na qual a unidade – U de atividade enzimática hidrolítica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições propostas;

Δabs – variação de absorvância no intervalo de tempo transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorvância;

f – fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol, cujo valor é 109,3 μmol/L para cubeta de vidro;

V_R – volume (L) reacional;

Δt – tempo (min) decorrido de análise;

M_A – massa (g) de enzima imobilizada utilizada.

3.3.2. Cálculo do rendimento de imobilização

O cálculo do rendimento de imobilização pode ser definido como a razão entre a atividade hidrolítica da enzima imobilizada e a atividade da enzima solúvel (EMREGUL *et al.*, 2006; BRIGIDA, 2010).

$$R (\%) = \left(1 - \frac{At_s}{At_b} \right) \times 100 \quad (4.2)$$

Sendo,

At_s – Atividade hidrolítica medida no sobrenadante após um dado período de imobilização (U);

At_b – Atividade hidrolítica medida numa solução branco de mesma concentração inicial que a solução destinada à imobilização, após o mesmo período destinado a At_s (U).

3.3.3. Cálculo da atividade recuperada (At_{rec})

A atividade recuperada é dada pela relação de quanto das enzimas teoricamente imobilizadas, que se encontram ativas (BRIGIDA, 2010).

$$At_{rec} (\%) = \left(\frac{At_d}{\frac{At_0}{Ms} \times R} \right) \times 100 \quad (4.3)$$

Sendo,

At_d – Atividade hidrolítica medida no derivado (U/g);

At_0 – Atividade hidrolítica na solução inicial de enzima (U);

Ms – Massa do derivado (g);

R – Rendimento de imobilização (%).

3.3.4. Determinação do teor de proteína

Para a determinação do teor de proteína presente na solução de lipase, utilizou-se a metodologia de Lowry, que se baseia na reação entre os íons cobre com as ligações peptídicas formando um complexo de cor púrpura proporcional à concentração de proteínas presente na solução enzimática. O preparo do reagente de Folin-Ciocalteu é dado pela diluição de 1 mL do reagente concentrado em 2 mL de água destilada, em seguida recolhido em um Becker protegido da luz até o momento da análise, tendo em vista a sua oxidação espontânea. Uma solução A é preparada pela adição de 1 mL de solução de Tartarato duplo de sódio e potássio (2%) em 1 mL de solução de sulfato de cobre (1%), em seguida, diluído em 98 mL de solução de carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1 M.

A análise é iniciada adicionando 4 mL da solução A em 1 mL da amostra contida em um tubo de ensaio, e deixar reagir por 10 min no escuro. Ao final, adicionar 0,4 mL da solução de Folin-Ciocalteu à mistura de reação e deixar reagir por 30 min no escuro. Após os 40 min de reação, a amostra foi homogeneizada por, aproximadamente, 1 min e, em seguida, foi realizada a leitura de absorbância à temperatura ambiente, em um espectrofotômetro UV-Visível, no comprimento de onda de 660 nm (LOWRY *et al.*, 1951).

Uma curva padrão para a dosagem de proteína foi previamente construída, correlacionando os valores de absorbância obtidos a partir da leitura de soluções de albumina de soro bovino (BSA) a concentrações conhecidas de proteína, variando-se a concentração entre 0 e 100 mg de proteína/L (ANEXO A – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO). A determinação do teor de proteína adsorvida por grama de suporte foi realizada conforme mostra a Equação 4.4.

$$Pt_{adsorvida} (mg/g \text{ de suporte}) = \frac{(Pt_i - Pt_f) \times V}{Ms} \quad (4.4)$$

Sendo,

Pt_i – concentração de proteína oferecida (mg/mL);

Pt_f – concentração de proteína no sobrenadante após o período de imobilização (mg/ml);

V – volume total da solução de enzima (mL);

Ms – massa total do suporte utilizado para a imobilização (g).

3.3.5. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

Um estudo sobre a estrutura da proteína da lipase foi realizado através da análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, com a finalidade de avaliar a presença das proteínas e das ligações peptídicas do biocatalisador, causado pela exposição ao dióxido de carbono supercrítico.

Cerca de 3 mg da lipase imobilizada antes e após o pré-tratamento com CO₂-SC foram misturadas com 350 mg de KBr e comprimida sobre um molde. Os espectros foram coletados no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹ a temperatura ambiente, utilizando o espectrofotômetro FTIR-VERTEX 70 da Bruker.

3.3.6. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

É um método termoanalítico utilizado para avaliar as mudanças nas propriedades físicas e químicas dos materiais. Aplicada às enzimas, esta análise tem o objetivo de identificar a que temperatura 50% das proteínas sofreram desnaturação (T_m e ΔH). O princípio da análise está baseado na comparação do fluxo de calor da amostra de interesse com um material de referência disposto sobre uma base de metal altamente condutora – geralmente de platina, e que são aquecidos ou arrefecidos a uma mesma taxa. O fluxo é aferido através de termopares posicionados sob cada cadinho, obtendo um sinal proporcional à diferença de capacidade térmica entre a amostra e a referência. Então é gerado uma curva potencial elétrico [μV] versus tempo e a área sob o pico é diretamente proporcional à mudança de entalpia e a sua direção indica se o evento é endotérmico ou exotérmico (WENDHAUSEN *et al.*, 2002).

As curvas de DSC foram realizadas em um calorímetro de varredura diferencial V4.7A da TA instruments, previamente calibrado com um padrão de índio (temperatura de fusão = 157,99 °C e entalpia de fusão = 27,05 J/g). Foi utilizada, aproximadamente, 5 mg de enzima imobilizada não tratada e tratada com CO₂-SC. Os experimentos foram realizados, variando a temperatura de 30 a 200 °C em incrementos de 10 °C por minuto, com fluxo de ar de 50 mL por minuto.

3.3.7. Efeito da concentração do substrato (p-NFL) sobre a velocidade de reação da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A influência da concentração do substrato na velocidade da reação foi estudada usando p-nitrofenil laurato como substrato para a reação de hidrólise catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre ou imobilizada, com e sem o pré-tratamento com CO₂-SC. A análise de atividade enzimática foi realizada à temperatura ambiente e pH 7, variando a concentração do substrato de 0,05 a 2,0 mM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos, incluindo os parâmetros do processo de imobilização, e os estudos da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em suportes aniônicos e catiônicos, além da comparação com a TLL comercial, a Lipozyme TL IM. Este estudo abrange a análise do efeito do dióxido de carbono supercrítico sobre a atividade hidrolítica da lipase; a avaliação de possíveis mudanças nas ligações entre a cadeia polipeptídica da enzima bem como da ligação entre o suporte e a lipase; a análise da termoestabilidade do complexo enzima-suporte decorrente do uso do CO₂-SC e a avaliação do efeito da concentração do substrato.

4.1. Parâmetros de imobilização

A imobilização da TLL em suportes aniônicos e catiônicos foi realizada através da técnica de adsorção, em banho finito por 2 h, à temperatura ambiente e em tampão fosfato de sódio pH 7. Na Tabela 9 são apresentados os resultados decorrente da imobilização de forma comparada à enzima imobilizada comercial (Lipozyme TL IM). É possível observar que dentre os suportes utilizados na imobilização, o Amberlite IRA400 Cl⁻ apresentou maior atividade no derivado, quantidade de proteína adsorvida e atividade recuperada, embora maior rendimento de imobilização tenha sido observado utilizando o suporte Amberlite IR120 Na⁺. Além disso, o baixo teor de proteína adsorvida em Amberlite IR120 Na⁺ não reflete o esperado haja vista o alto rendimento de imobilização. E, quando comparadas com a enzima imobilizada comercial (Lipozyme TL IM), tanto a quantidade de proteína adsorvida quanto a atividade no derivado foram menores.

Tabela 9 - Parâmetros do processo de imobilização por adsorção da lipase de *T. lanuginosus* a pH 7 em suportes aniônico e catiônico após 2h de contato.

Parâmetros	IR120 Na ⁺	IRA400 Cl ⁻	Lipozyme TL IM
Atividade no derivado (U/g)	2,7 ± 0,4	7,0 ± 0,7	8204 ± 187
Proteína adsorvida (mg/g suporte)	< 0,0001	0,0593 ± 0,006	98,2 ¹
Rendimento de imobilização (%)	80,4	7,8	-
Atividade Recuperada (%)	2,7	72,9	-

Carga oferecida 0,3714 ± 0,01 U/mL.

¹ Simas, 2008.

A retenção da atividade no derivado Amberlite IR120 Na⁺ (2,7 ± 0,4 U/g) pode estar relacionada a ocorrências indesejadas de ligações entre o sítio catalítico da enzima e o suporte ou até mesmo pelas moléculas da enzima terem se ligado em uma configuração que as tornaram inativas. Essas mudanças puderam tanto promover um aumento, tornando o centro ativo da enzima mais ativo, quanto uma diminuição da atividade enzimática. Essa inativação é confirmada pela grande diferença entre o rendimento de imobilização e resultado de atividade recuperada (2,7%), sendo este parâmetro definido como a quantidade de enzimas que se encontram ativas após a imobilização.

Os estudos realizados por Dharmstithi & Luchai (1998) corroboram com um rendimento de, aproximadamente, 82% após o processo de imobilização da lipase de *Aeromonas sóbria* em Amberlite IR120 Na⁺. Todavia, os autores evidenciaram uma alta estabilidade enzimática através de um estudo de reutilização da enzima imobilizada por cinco ciclos de operação

seguido da regeneração do suporte. Por outro lado, Abdel-Naby *et al.* (1998) mostraram uma alta atividade enzimática de uma protease de *B. mycooides*, cerca de 28,09 U/g de suporte, com um baixo rendimento de imobilização (15%).

Em relação ao teor de proteína total adsorvida, não foi possível a quantificação no suporte Amberlite IR120 Na⁺ pelo método de Lowry *et al.* (1951), com modificações. Todavia, um estudo realizado por Spinelli *et al.* (2013) quantificou cerca de 0,0213 mg de proteína/g suporte utilizando o suporte Amberlite IR120 H, porém utilizando a *Trametes versicolor* lacase. Em 1998, Abdel-Naby *et al.* determinaram o teor de proteína da protease de *B. mycooides* imobilizada em Amberlite IR120 Na⁺ utilizando o método de Lowry *et al.* (1951) e obtiveram, aproximadamente, 6,64 mg de proteína/g de suporte. Recentemente, um estudo utilizando a TLL imobilizada em suporte cuja matriz polimérica foi o estireno/divinilbenzeno alcançou um teor de proteína de 108,7 mg/g de suporte, utilizando a ligação covalente como técnica de imobilização (ALVES *et al.*, 2016). Assim, como foi possível detectar altos e baixos teores de proteínas imobilizados por Lowry, pode-se supor que a metodologia utilizada neste trabalho deve ser reavaliada.

Por outro lado, foi observado um alto rendimento de imobilização, que representa o quanto de enzima foi teoricamente imobilizada, em Amberlite IR120 Na⁺ quando comparado com o suporte Amberlite IRA400 Cl⁻. Isto, está relacionado a uma maior interação da lipase de *T. lanuginosus*, que apresenta ponto isoelétrico de 4,4 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) com suportes catiônicos. Esse resultado é confirmado pela relação entre o pH do meio com o ponto isoelétrico (pI) da enzima, ou seja, quando o pH > pI as moléculas de proteína estarão carregadas negativamente. Portanto, as interações eletroestáticas serão favoráveis em função da atração enzima-suporte, sendo a capacidade máxima de adsorção observada próximo ao ponto isoelétrico da enzima (TALBERT & GODDART, 2012; RABE *et al.*, 2011; KNEZEVIC *et al.*, 2004).

4.2. Estudo da lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em Amberlite IR120 Na⁺

4.2.1. Efeito do CO₂ supercrítico sobre a atividade hidrolítica da TLL imobilizada

A avaliação da influência das condições supercríticas do dióxido de carbono sobre a atividade hidrolítica da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Amberlite IR120 Na⁺ foi investigada através de um delineamento fatorial fracionado considerando três fatores (temperatura, pressão e tempo de exposição), dois níveis (+1 e -1) e triplicata no ponto central.

De acordo com os resultados apresentados na

Tabela 10, observou-se uma influência negativa do dióxido de carbono supercrítico sobre a atividade hidrolítica da TLL imobilizada em Amberlite IR120 Na⁺, resultando em uma redução $\geq 83\%$ em relação à atividade medida sem o pré-tratamento com CO₂-SC. Tais resultados podem ser explicados devido ao tipo de interação da lipase com o suporte, que pode ter sido intensificado com a aplicação do fluido supercrítico, resultando numa redução brusca de atividade enzimática.

Em consequência disto, não foi possível avaliar estatisticamente os efeitos das variáveis independentes (temperatura, pressão e tempo de exposição). Independentemente desses resultados obtidos, amostras da lipase antes e após o tratamento, sendo esta, nas condições dos experimentos 1 e 10 foram submetidas às análises de FTIR e calorimetria exploratória diferencial – DSC.

Tabela 10 - Resultado da atividade residual a partir do planejamento experimental para a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em IR120 Na⁺.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	tempo de exposição (h)	Atividade Residual (%)
Sem tratamento	-	-	-	100
1	35	100	1	17
2	35	100	6	≤ 11
3	35	300	1	≤ 11
4	35	300	6	≤ 11
5	75	100	1	≤ 11
6	75	100	6	≤ 11
7	75	300	1	≤ 11
8	75	300	6	≤ 11
9	55	200	3,5	≤ 11
10	55	200	3,5	11
11	55	200	3,5	≤ 11

Atividade inicial: 2,7 U por g de suporte.

4.2.2. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

As proteínas são, principalmente, caracterizadas pelas bandas de amida primária e amida secundária, sendo estas ligações que ligam os aminoácidos. Devido à complexidade das ligações polipeptídicas das enzimas, torna-se difícil correlacionar de forma direta com a estrutura da proteína estudada.

Tabela 11 - Grupos funcionais presentes no suporte Amberlite IR120 Na⁺

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionais
699, 758 e 829	Vibrações das ligações C–H do anel aromático fora do plano
1064	Vibrações das ligações C–H do anel aromático no plano
1413; 1214	Grupos sulfonatos (–SO ₃ ⁻)
1663	Alongamento das ligações C=C do anel aromático
3400	Ligação O–H

De acordo com Anwar *et al.* (2017), Collins *et al.* (2011), Soares (2004) e Kalsi (1995), a absorção entre 1550 e 1650 cm⁻¹ está associada à banda amida I, que é caracterizada pelas vibrações de alongamento da ligação C=O da amida, enquanto que a absorção associada à banda amida II leva principalmente às vibrações de flexão da ligação N–H e da vibração de C–N, cuja

região de absorção encontra-se em torno de 1550 cm^{-1} . A Figura 9 apresenta os espectros do infravermelho do suporte Amberlite IR120 Na^+ e da TLL imobilizada na presença e ausência de pré-tratamento com CO_2 supercrítico. E a Tabela 11 sintetiza as bandas espectrais e seus grupos funcionais presentes no espectro para o suporte Amberlite IR120 Na^+ .

O suporte Amberlite IR120 Na^+ é composto de uma matriz polimérica de estireno/divinilbenzeno e um grupo funcional formado por ácido sulfônico. A presença das ligações C–H do anel aromático fora do plano são confirmadas pelos picos de baixa intensidade em torno de 699 cm^{-1} , 758 cm^{-1} e 829 cm^{-1} . Enquanto que as ligações C–H do anel de benzeno no plano são observadas pelas bandas entre 900 e 1064 cm^{-1} . Os grupos sulfonatos ($-\text{SO}_3^-$) que participam da troca iônica estão localizados na região de 1130 - 1200 cm^{-1} (SMITH, 1999; CORTINA et al., 1994).

O modo de alongamento das ligações C=C do anel de benzeno são identificadas pelas bandas entre 1580 a 1663 cm^{-1} . Nota-se que nos espectros da enzima imobilizada sem e com tratamento há uma redução da intensidade desta banda que pode estar associado a sobreposição das bandas de amida primária e secundária que estão localizadas entre 1550 e 1650 cm^{-1} e com a banda da ligação C=C do anel de benzeno do suporte. Em 2010, Aybastier & Demir estudaram a imobilização da TLL em solução (Lipozyme TL 100 L) em suporte, a base de estireno/divinilbenzeno, através de uma ligação covalente. Os autores evidenciaram a presença das bandas de amina I e II próximo à região de 1678 cm^{-1} .

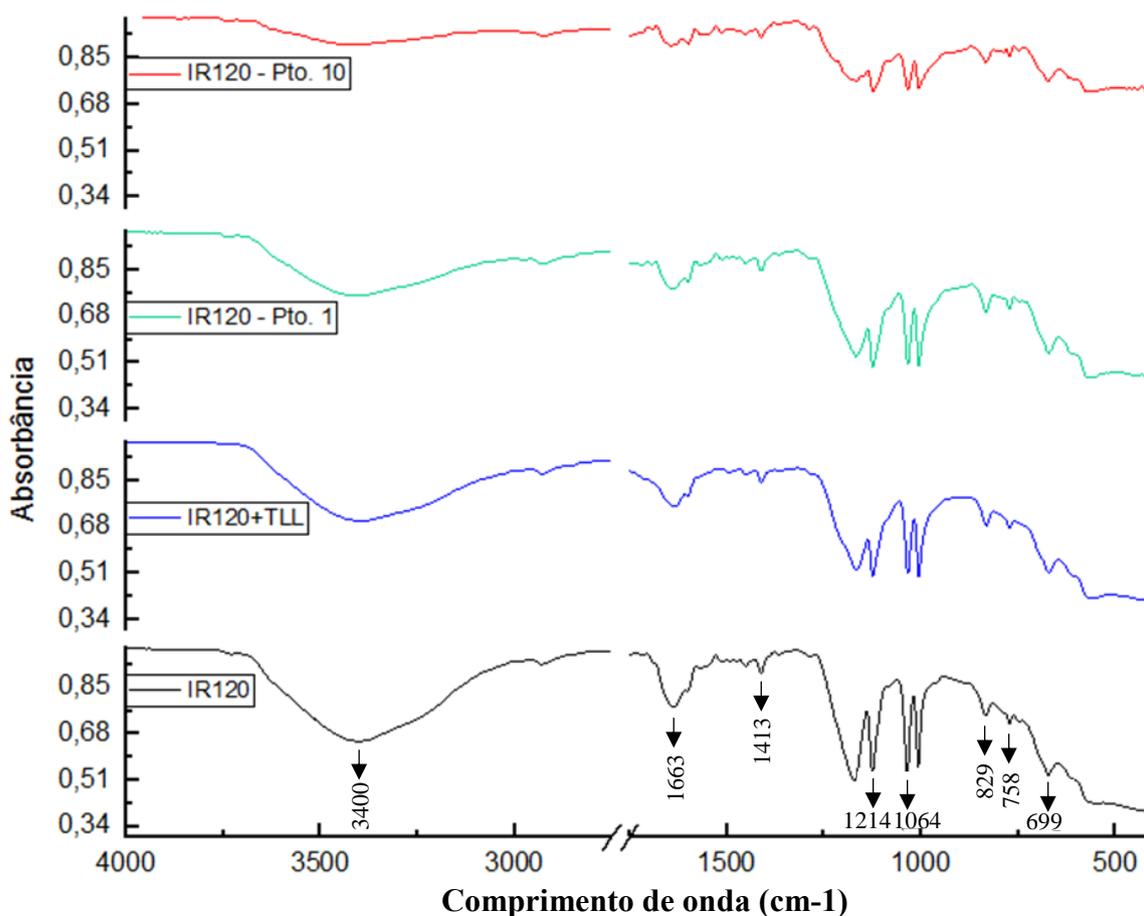


Figura 9 - Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier do suporte Amberlite IR120 Na^+ (em preto), da TLL imobilizada em Amberlite IR120 Na^+ antes (em azul) e após (em verde – experimento 1 e vermelho – experimento 10) o tratamento de CO_2 supercrítico.

Uma banda larga e intensa na região em torno de 3400 cm⁻¹ está associada à presença da ligação O–H da molécula de água formada durante a etapa de polimerização. Em decorrência de processos de secagem após a imobilização, é observada a redução da intensidade desta banda e mais ainda, quando a amostra é submetida ao dióxido de carbono supercrítico. Foi observado que o espectro, relativo ao experimento 10, apresentou a menor intensidade desta banda, podendo-se concluir que devido às maiores condições severas de pressão (200 bar) e temperatura (55 °C), a umidade presente no complexo enzima-suporte foi reduzida.

4.2.3. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

A estabilidade térmica e conformacional da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Amberlite IR120 Na⁺ foi investigada através da análise de DSC. Os resultados da variação de entalpia e da temperatura de fusão, dado pelas curvas de DSC (Apêndice A), para as diferentes amostras tanto antes quanto depois do tratamento com CO₂-SC foram compilados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da análise de DSC para TLL imobilizada em IR120 Na⁺ antes e após o pré-tratamento com CO₂-SC

Parâmetros	IR120 Na ⁺	TLL livre	TLL + IR120 Na ⁺	Experimentos	
				1	10
T (°C)	-	-	-	35	55
P (bar)	-	-	-	100	200
t (h)	-	-	-	1	3,5
At. Residual (%)	-	-	100	17	11
T_m (°C)	127,70	110,65	135,85	132,77	141,28
ΔH (J/g)	627,8	1293	748,8	334,5	590,7

Observando a temperatura média de desnaturação, a lipase na forma livre se mostrou menos estável frente à mesma enzima imobilizada em IR120 Na⁺ e menos ainda frente a mesma enzima pré-tratada com CO₂-SC, tendo em vista a menor T_m (110,65 °C), que está relacionada com a desnaturação de 50% das proteínas. A mais estável foi observada para a amostra pré-tratada na condição de 55 °C, 200 bar e 3,5 h, com valor de 141,28 °C. Adak *et al.* (2015) e Noel & Combs (2003) constataram efeito semelhante da temperatura média de desnaturação sobre a estabilidade da proteína *Rhizopus oryzae* lipase e *Rhizomucor miehei* lipase, respectivamente.

Ao comparar as amostras submetidas ao dióxido de carbono supercrítico, observa-se que a maior temperatura e entalpia de desnaturação foi obtida no experimento 10, cerca de 141,28 °C e 590,7 J/g, respectivamente. Representando maior resistência térmica, embora a redução do delta H mostre menor quantidade de energia total para promover a desnaturação. Esse resultado corrobora com a conclusão extraída da maior temperatura de desnaturação. Mais ainda, o dióxido de carbono atuou como um protetor na superfície do suporte. Esse fenômeno é bastante conhecido como o poder de solvatação característico dos fluidos supercríticos.

4.3. Estudo da lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻
4.3.1. Efeito do CO₂ supercrítico sobre a atividade hidrolítica da TLL imobilizada

A ação do CO₂ supercrítico sobre a TLL imobilizada em suporte aniônico (Amberlite IRA400Cl⁻) foi verificada através de um planejamento composto central rotacional (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultado de atividade residual da Lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em IRA400 Cl⁻ segregado por lote de imobilização.

Data de imobilização	Lote	Experimento	T (°C)	P (bar)	t (h)	Atividade Residual (%)
-	-	Sem tratamento	-	-	-	100
11/06/2018	1	1	45	135	2,25	25
11/06/2018	1	8	65	245	4,75	157
20/07/2018	2	15	55	190	3,5	132
20/07/2018	2	6	65	135	4,75	86
20/07/2018	2	9	55	190	1	141
20/07/2018	2	13	35	190	3,5	91
20/07/2018	2	7	65	245	2,25	60
03/08/2018	3	5	65	135	2,25	56
03/08/2018	3	3	45	245	2,25	94
03/08/2018	3	14	75	190	3,5	41
03/08/2018	3	17	55	190	3,5	112
28/08/2018	4	12	55	300	3,5	122
28/08/2018	4	11	55	80	3,5	98
28/08/2018	4	10	55	190	6	111
05/09/2018	5	4	45	245	4,75	68
05/09/2018	5	2	45	135	4,75	114
05/09/2018	5	16	55	190	3,5	123

Durante as análises, foi observado que o uso de diferentes lotes de enzimas imobilizadas neste processo causou uma alta instabilidade dos valores de atividade hidrolítica medida antes do pré-tratamento, impossibilitando uma análise estatística das variáveis independentes. Em vista disso, foi realizada uma análise em blocos de acordo com os lotes de TLL imobilizada. Foi verificado a existência de superativação e inativação da TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ após o tratamento com CO₂ supercrítico, com variação de 25 a 157% na atividade residual. O melhor resultado foi obtido a 65 °C, 245 bar e 4,75 h, com atividade hidrolítica 57%

maior que a atividade inicial, sendo este o melhor resultado. Em contrapartida, o pior resultado foi alcançado na condição de 45 °C, 135 bar e 2,25 h, quando a atividade reduziu 75%.

Nos pontos axiais, as variáveis de tempo de exposição e pressão se mostraram favoráveis ao pré-tratamento com CO₂, com variação de 98 a 141%. Por outro lado, os pontos axiais de temperatura influenciaram negativamente na atividade hidrolítica final, variando de 41 a 91%. Foi observado que, em altas temperaturas, a atividade é prejudicada, visto que a 75 °C, 190 bar e 3,5 h, a atividade residual foi reduzida em 59%.

Os resultados, referentes ao segundo e terceiro lote de TLL imobilizada, mostraram que fora do intervalo de 40 e 60 °C, a enzima perdeu parcialmente sua atividade hidrolítica, com variação negativa de 14 a 59% em relação à atividade inicial. O terceiro grupo mostrou uma forte influência da elevada temperatura sobre a atividade da TLL; esse resultado pode ser explicado pelo efeito da desnaturação enzimática. Além disso, em condições moderadas das variáveis independentes (55 °C, 190 bar e 3,5 h), a atividade final foi favorecida, levando a um aumento de 12% em relação à atividade inicial; e esse comportamento é corroborado nos experimentos 15 e 16, tendo em vista as mesmas condições operacionais.

No penúltimo lote, os experimentos foram realizados na mesma temperatura (55 °C), e foi observado que a baixa pressão, praticamente a atividade residual não foi influenciada (98%). Por outro lado, a pressão máxima (300 bar) acarretou numa elevada atividade hidrolítica residual (122%). Considerando os experimentos realizados em 55 °C e 190 bar, em todos, foi observado uma superativação. Além disso, foi verificado uma tendência de aumento da atividade residual, à medida que o tempo de exposição foi reduzido, sendo a máxima atividade obtida em 1 h.

Melgosa *et al.* (2015); Oliveira *et al.* (2006) e Lanza *et al.* (2004) adotaram condições de temperatura, pressão e tempo de exposição semelhantes ao proposto nessa dissertação, todavia, os autores pré-trataram as lipases comerciais B de *Candida antarctica* (Novozym 435) e *Rhizomucor miehei* (Lipozym RM IM). Nas referências citadas, não houve caso de superativação. O máximo alcançado foi a estabilidade da atividade em 100%, nas condições de 100 bar, 50 °C e 3 h para a Lipozym RM IM e em 110 bar, 35 °C e 1 h para a Novozym 435. Nas demais condições experimentais a atividade residual foi reduzida.

Franken *et al.* (2010) realizaram um estudo similar a este trabalho, todavia, foi utilizado propano supercrítico para pré-tratar a lipase Amano PS comercial. Foi observado através de um planejamento experimental que nas condições de 200 bar, 35 °C, 0,5 h e taxa de depressurização de 50 bar/min a atividade residual aumentou consideravelmente, cerca de 347%. Por meio de uma análise estatística realizada, os autores afirmaram que a temperatura afetou negativamente, por outro lado, a taxa de depressurização afetou positivamente sobre a atividade da lipase. Esses resultados corroboram com um estudo realizado por Knez & Habulin *et al.* (2002). Fenômenos de superativação utilizando propano e gás liquefeito de petróleo (LPG) também foram observados por Kuhn *et al.* (2011); Andrade *et al.* (2008).

O fenômeno de superativação pode estar associado com o poder de solvatação, característico dos fluidos supercríticos. Em que, sob altas pressões, a densidade do CO₂ é tão elevada que suas interações moleculares se tornam fortes gerando uma “rede” que solvata as enzimas, agindo positivamente na atividade das mesmas. Esse fenômeno também está associado ao tipo de enzima estudada, tendo em vista as diferenças nas propriedades de cada enzima, principalmente, quando relacionadas à sua estabilidade.

4.3.2. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

O suporte Amberlite IRA400 Cl⁻ apresenta uma matriz polimérica composta por estireno/divinilbenzeno e um grupo ativo de quaternário de amônio. Na Tabela 14 é possível

observar os comprimentos de onda, correlacionados aos seus grupos funcionais presentes no espectro para este suporte.

Tabela 14 - Grupos funcionais presentes no suporte Amberlite IRA100 Cl⁻

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionais
704, 765, 835, 855, 890, 920	Deformação fora do plano da ligação C–H do anel aromático; estiramento da ligação C–N do grupo N-CH ₃
1490	Grupo quaternário de amônio
1490	Vibrações das ligações de C–H e C=C dos grupos de cadeias alquílicas
1612	Estiramento da ligação C=C do anel de benzeno
1488	Deformação assimétrica da ligação C–H do grupo CH ₃
3400	Estiramento da ligação O–H da molécula de água

A presença da enzima foi confirmada pelas bandas de amida primária e secundária que foram identificadas na faixa de 1550 a 1650 cm⁻¹ caracterizadas pelas vibrações de alongamento da ligação C=O e flexão da ligação N–H e da vibração de C–N, sendo estas ligações que compõem os aminoácidos formando a proteína (ANWAR *et al.*; 2017; COLLINS *et al.*, 2011; SOARES, 2004; KALSI, 1995). Observou-se que nos espectros da enzima imobilizada sem e com tratamento, ocorreu uma redução da intensidade da banda que pode estar associada à sobreposição com as bandas entre 1475 – 1612 cm⁻¹, característica do estiramento da ligação C=C do anel de benzeno (TRABOULSI *et al.*, 2012). A Figura 10 apresenta os espectros do infravermelho do suporte Amberlite IRA400 Cl⁻ e da TLL imobilizada na presença e ausência de tratamento com CO₂ supercrítico.

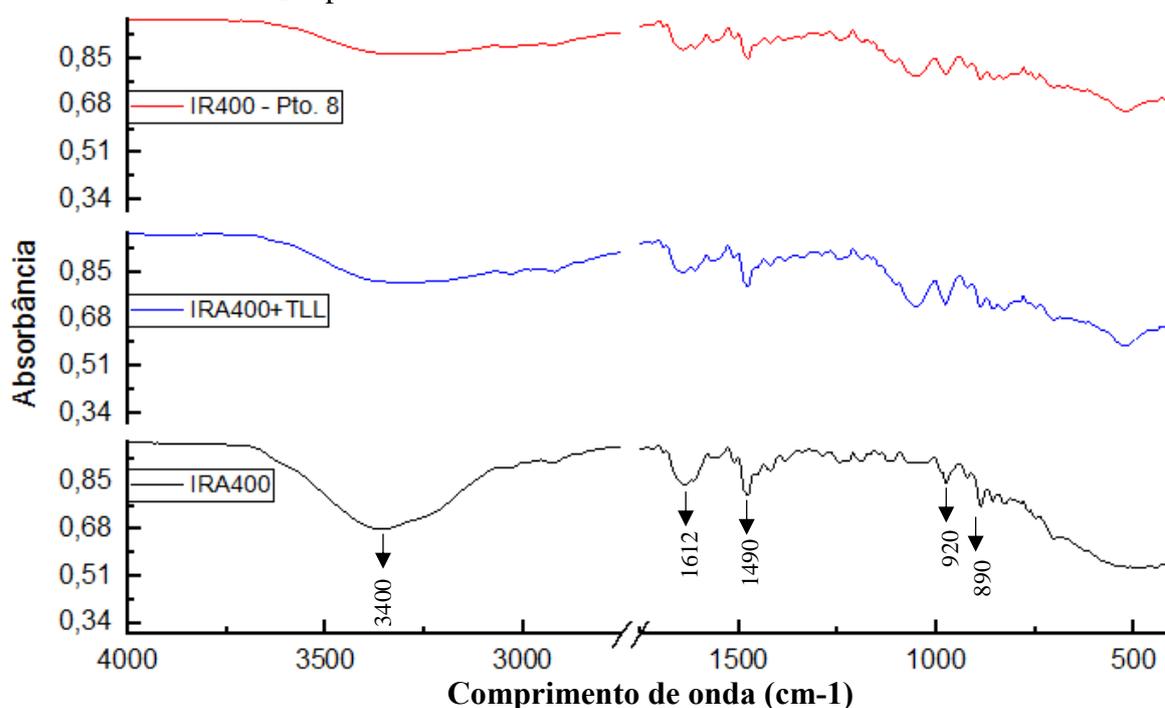


Figura 10 - Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier do suporte Amberlite IRA400 Cl⁻ (em preto), da TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ antes (em azul) e após (em vermelho – experimento 8) o tratamento de CO₂ supercrítico.

A presença da molécula de água também é observada neste suporte entre 3100-3700 cm^{-1} , característico do estiramento da ligação O–H, devido à polimerização do estireno-divinilbenzeno. A intensidade desta banda é minimizada após a imobilização da enzima e mais ainda após o pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico. Postula-se que este fenômeno é decorrente das etapas de secagem e do tratamento com fluido supercrítico, ambas com potencial de reduzir o teor umidade do complexo enzima-suporte.

A deformação fora do plano da ligação C–H do anel aromático e o estiramento da ligação C–N do grupo N-CH₃ foram identificadas nos comprimentos de onda em 704, 765, 835, 855, 890, 920 cm^{-1} . Os modos de estiramento da ligação C=C dos anéis de benzeno foi observado entre 1475-1612 cm^{-1} . Os grupos de cadeias alquílicas foram evidenciados entre 1450 e 1490 cm^{-1} , caracterizados pelas ligações de C–H e C=C. Além disso, a deformação da ligação C–H do grupo CH₃ pode ser observado em 1488 cm^{-1} (TRABOULSI *et al.*, 2012; KALSI, 1995). Picos referentes ao grupo ativo, quaternário de amônio foram evidenciados na região ao redor de 1470 e 1490 cm^{-1} (URBANO *et al.*, 2015).

4.3.3. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

A termoestabilidade da TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ com e sem pré-tratamento foi investigada através da análise por calorimetria exploratória diferencial. A escolha das amostras para a análise de DSC foram baseadas nas seguintes considerações: melhor resultado de atividade residual (experimento 8), condição máxima de pressão (experimento 12) e condições medianas de temperatura, pressão e tempo de exposição (experimento 15).

Os resultados da variação de entalpia e da temperatura de fusão, dado pelas curvas de DSC, para as diferentes amostras tanto antes quanto depois do tratamento com CO₂-SC foram compilados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados da análise de DSC para TLL imobilizada em IRA400 Cl⁻ antes e após o pré-tratamento com CO₂-SC.

Parâmetros	IRA400 Cl ⁻	TLL Livre	TLL + IRA400 Cl ⁻	Experimentos		
				8	12	15
T (°C)	-	-	-	65	55	55
P (bar)	-	-	-	245	300	190
t (h)	-	-	-	4,75	3,5	3,5
At. Residual (%)	-	-	100	156	122	132
At. Específica (U/mg de proteína)	-	5,25	117,98	230,64	150	69,1
T_m (°C)	132,66	110,65	137,79	145,34	138,93	139,18
ΔH (J/g)	502,8	1293	419,2	286,4	134,8	402,2
ΔH (kJ/mg de proteína)	-	5,49	7,07	4,83	2,27	6,78

O aumento da temperatura média de desnaturação apenas no experimento 8, pode estar relacionada ao maior tempo de exposição ao pré-tratamento com o CO₂-SC. Por outro lado é observado que em qualquer amostra que foi tratada, a entalpia diminuiu significativamente comparada com a amostra sem tratamento. A não linearidade dos valores de entalpia, quando

correlacionada à T_m , podem estar associadas às alterações moleculares decorrentes do desdobramento de proteínas. As mudanças foram devidas a uma combinação de reações endotérmicas, como a ruptura de ligações de hidrogênio, e reações exotérmicas, como a interrupção de interações hidrofóbicas (Li *et al.*, 2008). Esta afirmação contribui para o resultado de entalpia obtido na amostra de lipase imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ sem o tratamento com CO₂-SC, visto que esse valor foi menor em relação à amostra contendo apenas o suporte.

Considera-se ainda que o efeito do fluido supercrítico neste caso influenciou negativamente sobre essas ligações e foram evidenciados pela redução da entalpia em todas as amostras submetidas às condições supercríticas, cujo valor variou de 134,8 a 402,2 J/g. A menor energia foi obtida na maior pressão estudada (300 bar). Vale ressaltar que na condição de 55 °C, 190 bar e 3,5 h, a temperatura de desnaturação e a entalpia foram similares às amostras sem tratamento.

Chen *et al.* (2013b) e Liu *et al.* (2012) avaliaram a termoestabilidade das lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa* tratadas com dióxido de carbono supercrítico, respectivamente. Em ambos os estudos, os autores relataram uma queda tanto da temperatura (T_m) quanto da entalpia de desnaturação (ΔH), com redução de, aproximadamente, 10% em relação as lipases não tratadas, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho.

4.4. Estudo da TLL imobilizada comercialmente (Lipozyme TL IM)

4.4.1. Efeito do CO₂ supercrítico sobre a atividade hidrolítica da TLL imobilizada comercialmente

Para fins comparativos, um estudo da influência do CO₂ supercrítico sobre a atividade hidrolítica Lipozyme TL IM foi investigado através de um delineamento fatorial fracionado, considerando as mesmas variáveis independentes e condições operacionais aplicadas anteriormente. A Tabela 16 apresenta os resultados de atividade residual da Lipozyme TL IM.

Tabela 16 - Resultado de atividade residual a partir do planejamento experimental para a Lipozyme TL IM.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Tempo de exposição (h)	Atividade Residual (%)
Sem tratamento	-	-	-	100
1	35	100	1	70
2	35	100	6	76
3	35	300	1	80
4	35	300	6	107
5	75	100	1	66
6	75	100	6	46
7	75	300	1	52
8	75	300	6	118
9	55	200	3,5	90
10	55	200	3,5	96
11	55	200	3,5	92

Atividade inicial: 8204 U por g de suporte.

A atividade da Lipozyme TL IM após o tratamento com CO₂ supercrítico variou de 46 a 118% em relação a sua atividade inicial, ou seja, sem pré-tratamento, conforme mostra a Tabela 16. Observou-se uma influência da alta pressão e do elevado tempo de exposição sobre a atividade residual, caracterizado por uma superativação (>100%). Nas condições de 300 bar, 6 h e 35 °C a atividade aumentou 7% em relação a atividade hidrolítica inicial e, nas condições de 300 bar, 6 h e 75 °C, a atividade aumentou 18%. Isso mostra que todas as superativações ocorreram a 300 bar.

As menores atividades residuais foram alcançadas na condição máxima de temperatura. A 75 °C, 100 bar e 6 h, a atividade residual foi de 46%, seguido da condição de 75 °C, 300 bar e 1 h obtendo uma atividade residual de 52%. Esses resultados comprovaram que externamente aos limites de temperatura ótima, a TLL sofre o fenômeno de inativação por desnaturação, onde a influência da temperatura é maior do que a densidade de CO₂, permitindo todo o processo de desnaturação.

Estatisticamente, os efeitos das variáveis independentes (temperatura, pressão e tempo de exposição) foram avaliados considerando um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de regressão das variáveis estudadas e suas interações, bem como o erro padrão, t-valor e p-valor foram calculados em função atividade residual, e estão listados na uido **da** desnaturação da enzima.

Tabela 17.

De acordo com o p-valor apresentado, foi possível observar que todas as variáveis foram significativas, ou seja com p-valor < 0,05. Dentre todos os fatores analisados, a interação da pressão linear com o tempo de exposição linear mostrou-se mais significativa frente os demais fatores, apresentando um menor p-valor. Este resultado foi confirmado pelo t-valor, representado pelo diagrama de Pareto (Figura 11). Além disso, também foi observado que a temperatura influenciou negativamente na atividade residual da Lipozyme TL IM, apresentando um t-valor de -17,6995. Fato esse comprovado pela redução da atividade, seguido da desnaturação da enzima.

Tabela 17 - Coeficientes do modelo de regressão, erro padrão, t-valor e p-valor correspondentes à atividade residual da Lipozyme TL IM.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	P-valor
Média	115,0773	0,3015	0,0006
Temperatura (1L)	-0,6450	0,7071	0,0052
Pressão (2L)	-0,1219	0,7071	0,0087
Tempo de exposição (3L)	-8,5375	0,7071	0,0034
(1L) por (2L)	0,0011	0,7071	0,0266
(1L) por (3L)	0,0325	0,7071	0,0442
(2L) por (3L)	0,0535	0,7071	0,0007

Coeficiente de determinação (R^2) = 0,8025

Um modelo de regressão utilizando os valores codificados das variáveis independentes é apresentado na Equação 4.1.

$$Y = 115,0773 - 0,6450*T - 0,1219*P - 8,5375*t + 0,0011*T*P + 0,0325*T*t + 0,0535*P*t$$

(Eq. 4.1)

Sendo, Y a atividade residual, T a temperatura, P a pressão e t o tempo de exposição ao CO₂ supercrítico.

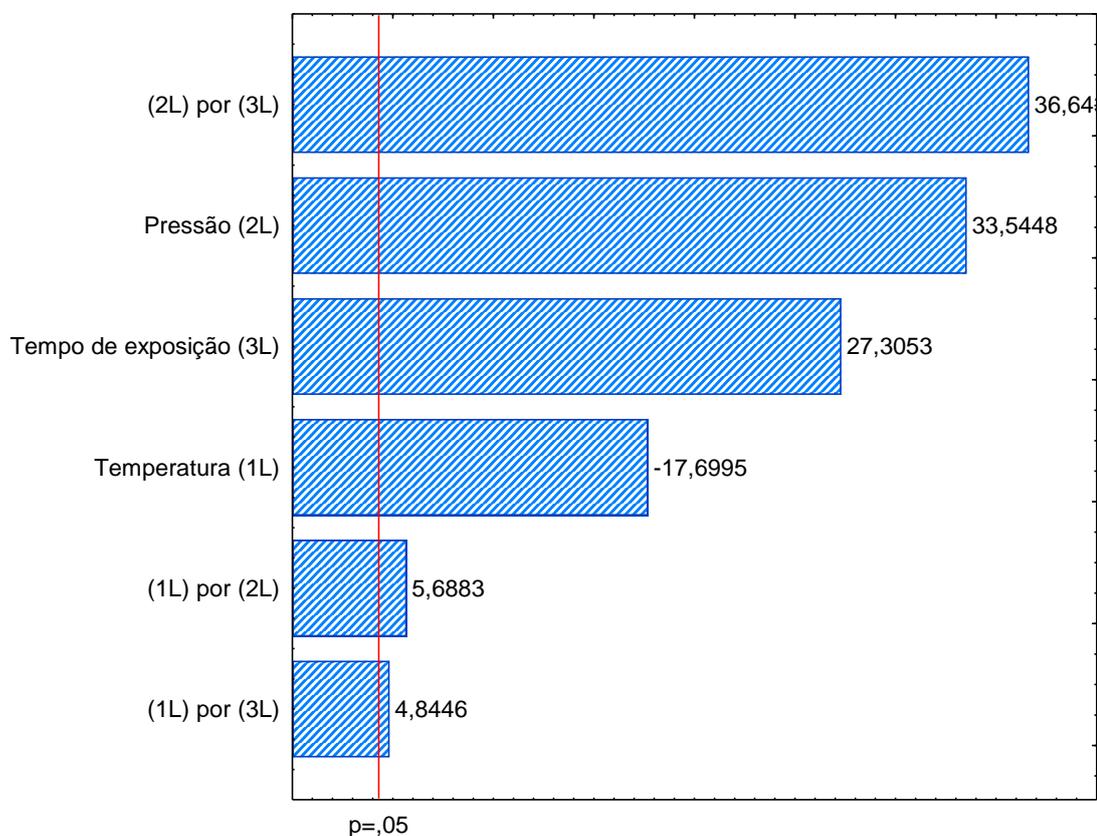


Figura 11 - Diagrama de Pareto para a análise da atividade residual da Lipozyme TL IM pré-tratada com CO₂ supercrítico.

O diagrama de Pareto, apresentado na Figura 11, corroborou os resultados apresentados anteriormente na uido da desnaturação da enzima.

Tabela 17, em que as melhores condições do pré-tratamento da Lipozyme TL IM foram as condições de pressão e tempo de exposição mais elevadas. Tendo em vista a avaliação da qualidade do ajuste do modelo, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada com intervalo de confiança de 95%. A

Tabela **18** apresenta os valores de F-calculado e F-tabelado, a soma quadrática, média quadrática, graus de liberdade e o p-valor.

Tabela 18 - Análise de variância para a atividade residual da Lipozyme TL IM.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F-cal	F-tab	P-valor
Regressão	4782,18	8	597,78	597,78	19,37	1,67E-03
Resíduo	2	2	1			
Total	4784,18	10				

$$R^2 = 0,8025$$

Observa-se que a análise de regressão é significativa, uma vez que o F-calculado (597,78) foi maior que o F-tabelado (19,37) e apresenta p-valor $< 0,05$. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,8025, indicando que o modelo é viável para explicar 80,25% da variação total dos parâmetros experimentais observados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo (Figura 12).

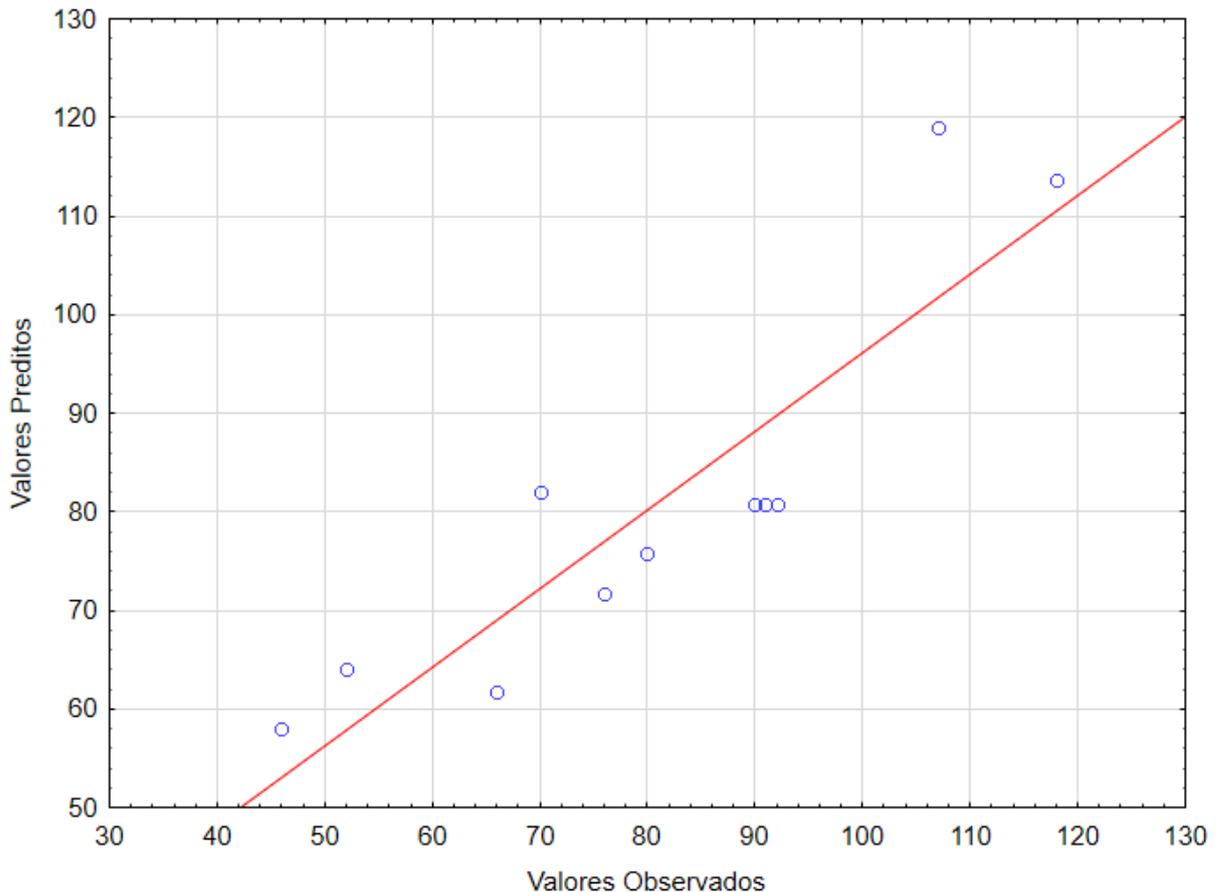


Figura 12 - Distribuição dos resíduos: valores preditos pelo modelo versus valores observados no experimento para atividade residual da Lipozyme TL IM.

A Figura 12 mostrou que as respostas experimentais obtidas para atividade residual apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica, com coeficiente de determinação de 80%. Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de respostas e definir regiões de interesse. As superfícies estão representadas nas Figura 13, 14 e 15. A região de máxima atividade residual ficou localizada em condições de pressão e tempo de exposição mais elevadas, resultando em atividades residuais acima de 100%, conforme mostra a Figura 13. As Figuras 14 e 15 indicaram que, com a elevação da temperatura, a atividade residual reduz independentemente da pressão ou tempo de exposição.

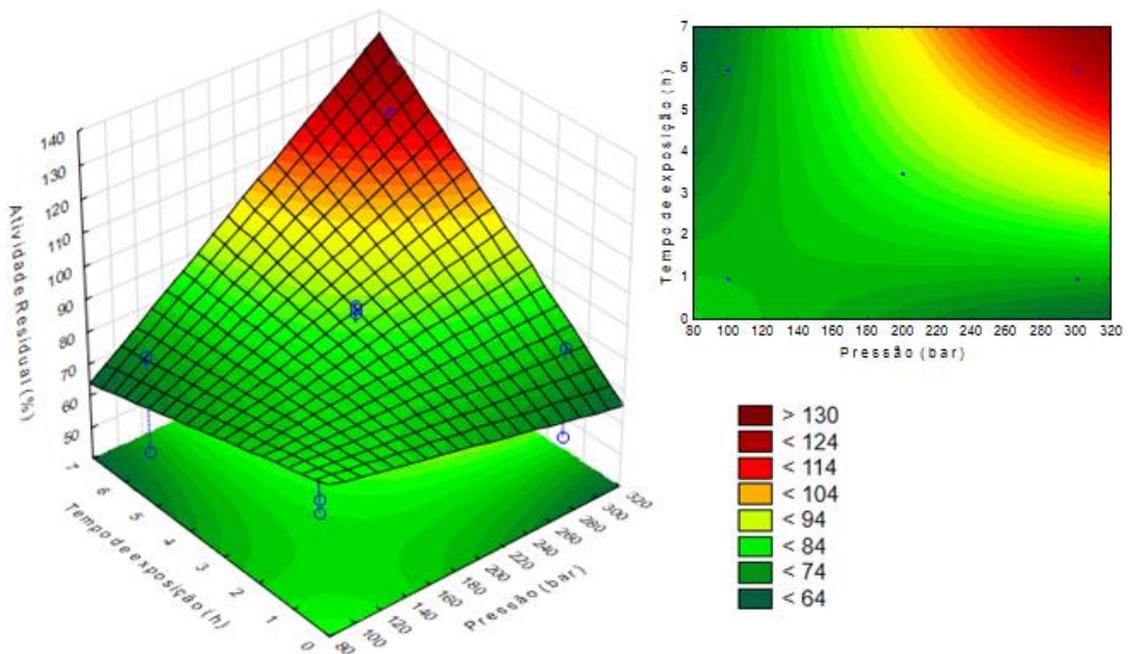


Figura 13 - Superfície de resposta da influência do tempo de exposição e pressão na atividade residual da Lipozyme TL IM.

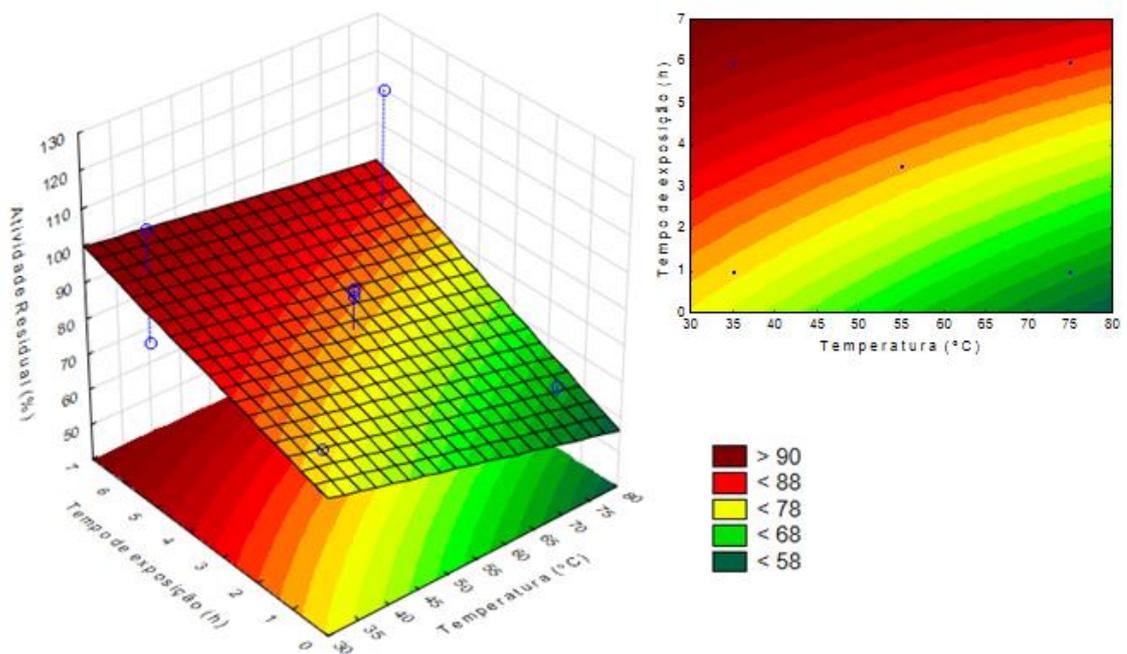


Figura 14 - Superfície de resposta da influência do tempo de exposição e temperatura na atividade residual da Lipozyme TL IM.

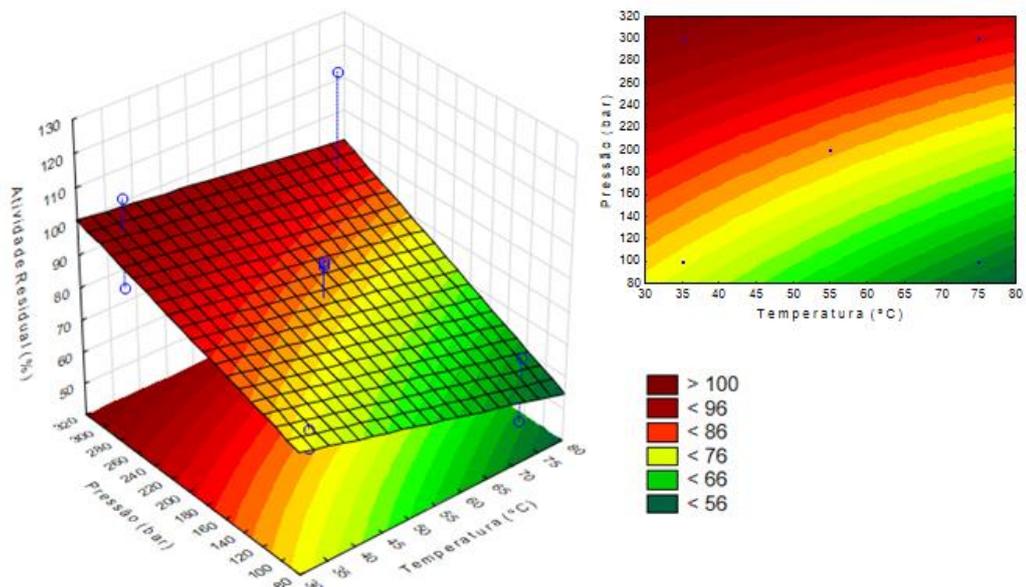


Figura 15 - Superfície de resposta da influência da pressão e temperatura na atividade residual da Lipozyme TL IM.

4.4.2. Espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

O espectro no infravermelho da Lipozyme TL IM (lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em sílica-gel), sem e com tratamento utilizando o CO₂ supercrítico é mostrado na Figura 16. As vibrações de estiramento da ligação Si–O e da deformação da ligação Si–OH foram detectadas entre 830-910 cm⁻¹ e 1020-1040 cm⁻¹, respectivamente. A presença da lipase é confirmada na região entre 1550 e 1650 cm⁻¹, que está associada à banda amida primária caracterizada pelas vibrações de alongamento da ligação C=O da amida e na região de absorção em torno de 1550 cm⁻¹, referente à banda amida secundária, principalmente às vibrações de flexão da ligação N-H e da vibração de C-N (COLLINS *et al.*, 2011; ANWAR *et al.*, 2017).

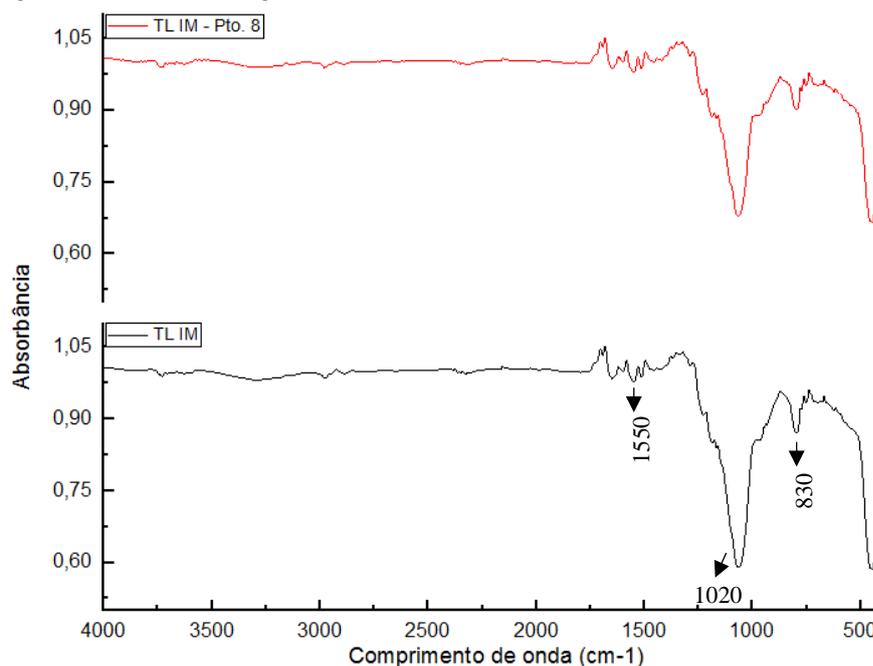


Figura 16 - Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier da Lipozyme TL IM antes (em preto) e após (em vermelho) o tratamento de CO₂ supercrítico.

4.4.3. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

A termoestabilidade da Lipozyme TL IM com e sem pré-tratamento foi investigada através da análise por calorimetria exploratória diferencial. A escolha das amostras para a análise de DSC foram baseadas nas seguintes considerações: melhor resultado de atividade residual (experimento 8), condição mínima e máxima de pressão (experimentos 2 e 3, respectivamente) e condições medianas de temperatura, pressão e tempo de exposição (experimento 10). Os resultados da variação de entalpia e da temperatura de fusão, dado pelas curvas de DSC, nas diferentes amostras tanto antes quanto depois do tratamento com CO₂-SC foram compilados na

Tabela 19.

É possível observar que a Lipozyme TL IM sem o tratamento com o CO₂-SC é menos estável, uma vez que o valor de T_m é o menor diante das demais amostras. Além disso, pode-se afirmar que não houve diferença entre os valores de entalpia de desnaturação entre as amostras da Lipozyme TL IM sem tratamento (61,86 J/g) com a amostra do experimento 2 (62,77 J/g). Esse resultado pode estar relacionado às condições brandas de temperatura e pressão aplicadas, 35°C e 100 bar.

Uma análise comparativa entre às amostras submetidas a condições supercríticas pode ser realizada, com o objetivo de entender os efeitos da temperatura, pressão e tempo de exposição em relação a sua conformação estrutural. A combinação de elevadas temperaturas, pressão e tempo de exposição (experimento 8), acarretou em uma maior estabilidade enzimática frente à mesma sem tratamento. Mais ainda, considerando apenas a pressão elevada (300 bar), a conformação da enzima é afetada radicalmente (entalpia de 19,31 J/g), como pode ser observado no experimento 3.

As mudanças endotérmicas estão associadas à quebra de pontes de hidrogênio, expondo os grupos hidrofóbicos da proteína, que é refletida pela área do pico endotérmico, representado pela mudança da entalpia (ΔH) e correlacionado com a extensão da estrutura requisitada de uma proteína (LI-CHAN & MA, 2002; KOSHIYAMA et al., 1981).

Tabela 19 - Resultados da análise de DSC para a Lipozyme TL IM antes e após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

Parâmetros	TL IM sem tratamento	Experimentos			
		2	3	8	10
T (°C)	-	35	35	75	55
P (bar)	-	100	300	300	200
t (h)	-	6	1	6	3,5
At. Residual (%)	100	79	80	118	96
At. Específica (U/mg de proteína)	83,5	63,4	66,6	98,3	80,3
T_m (°C)	141,17	155,80	157,02	144,69	152,32
ΔH (J/g)	61,86	62,77	19,31	66,15	71,14
ΔH (J/mg de proteína)	0,63	0,64	0,20	0,67	0,72

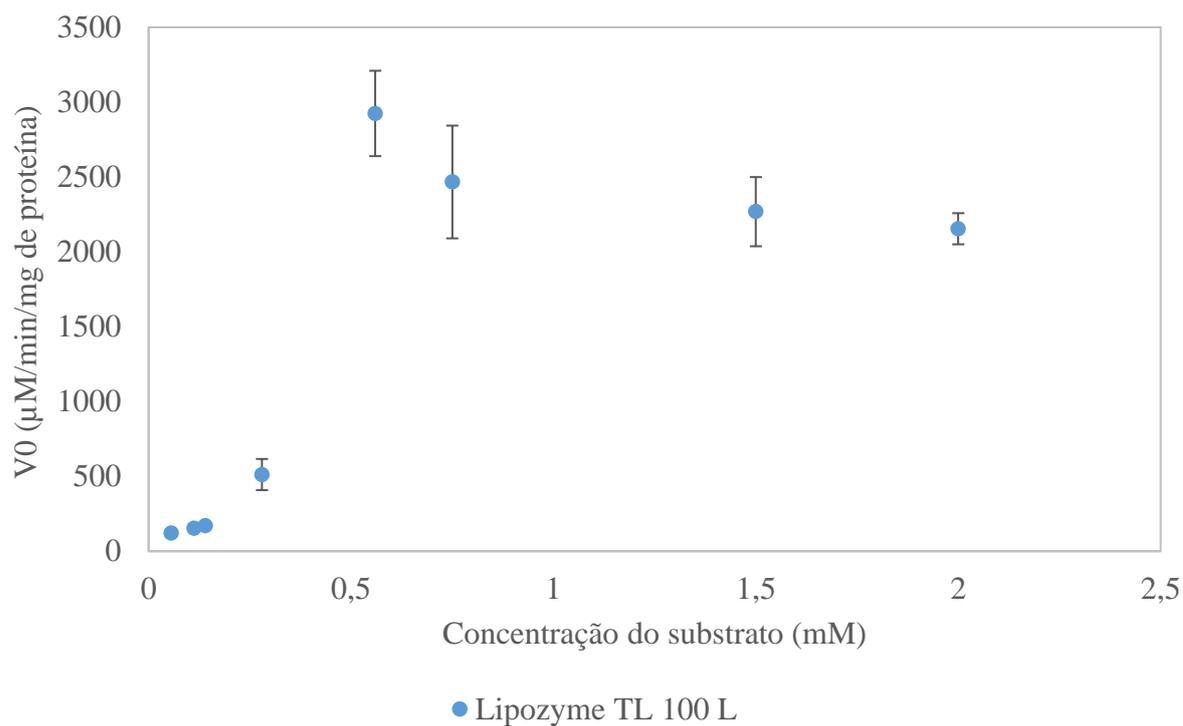
Além disso, observa-se que a maior entalpia foi alcançada no experimento 10, com valor igual a 71,14 J/g, cujas condições operacionais foram no ponto central (55 °C, 200 bar e 3,5h). Pode-se concluir que o dióxido de carbono agiu como uma barreira sobre a amostra, resistindo a desnaturação precoce frente as demais amostras.

A elevada termoestabilidade de enzimas após o pré-tratamento com CO₂-SC também foi relatada por Dhake *et al.* (2011), que afirmaram que a estabilidade da lipase de *Rhizopus oryzae* via imobilização para a síntese de éster de citronelol em SC-CO₂ foi melhorada. Liu *et al.* (2012) sugeriram que a estabilidade da lipase na presença do dióxido de carbono supercrítico depende do tipo de lipase, da forma e condições utilizadas.

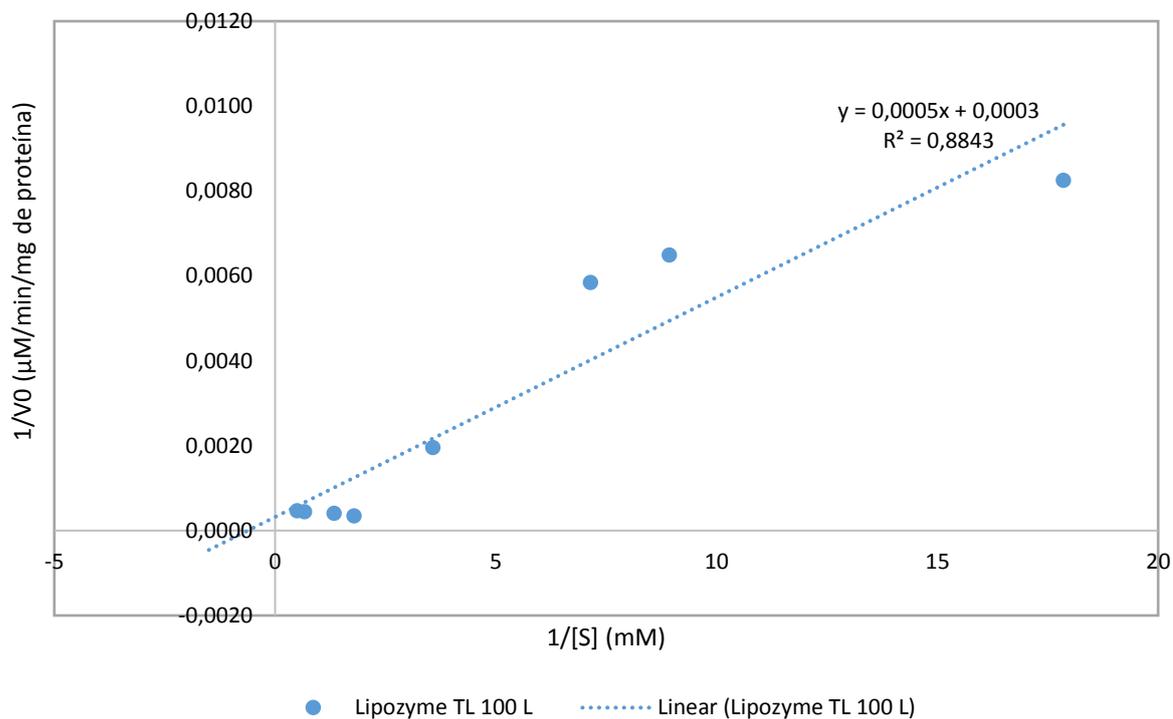
4.5. Efeito da concentração do substrato (p-NFL) sobre a velocidade de reação da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A influência do substrato sobre a velocidade da reação de hidrólise do p-nitrofenil laurato utilizando a lipase de *T. lanuginosus* como catalisador, foi investigada através da variação da concentração do substrato (0,05 a 2,0 mM) em pH 7 e temperatura ambiente. As figuras abaixo mostram esse efeito para cada amostra analisada, tanto antes quanto após o pré-tratamento com CO₂-SC: Lipozyme TL 100 L (Figura 17), TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ (Figura 18) e Lipozyme TL IM (Figura 19).

É possível observar que na maioria das amostras houve uma relação direta da velocidade da reação com a concentração do p-NFL em até, aproximadamente, 560 µM. A partir desta concentração, nota-se um efeito de inibição que pode estar associado tanto ao substrato quanto à formação de produtos seguido de um patamar de estabilidade. Na inibição pelo substrato ocorre uma diminuição progressiva da atividade em função do aumento da concentração do substrato, este fato pode indicar a não liberação do produto através do complexo enzima-substrato. Por outro lado, o excesso de produto pode também afetar negativamente a atividade da enzima. Para este último caso, o produto formado ficar confinado no sítio ativo da enzima impedindo que o local ativo esteja outra vez disponível para uma nova ligação enzima-substrato seguido da formação de mais produtos (YADAV & DEVI, 2004).

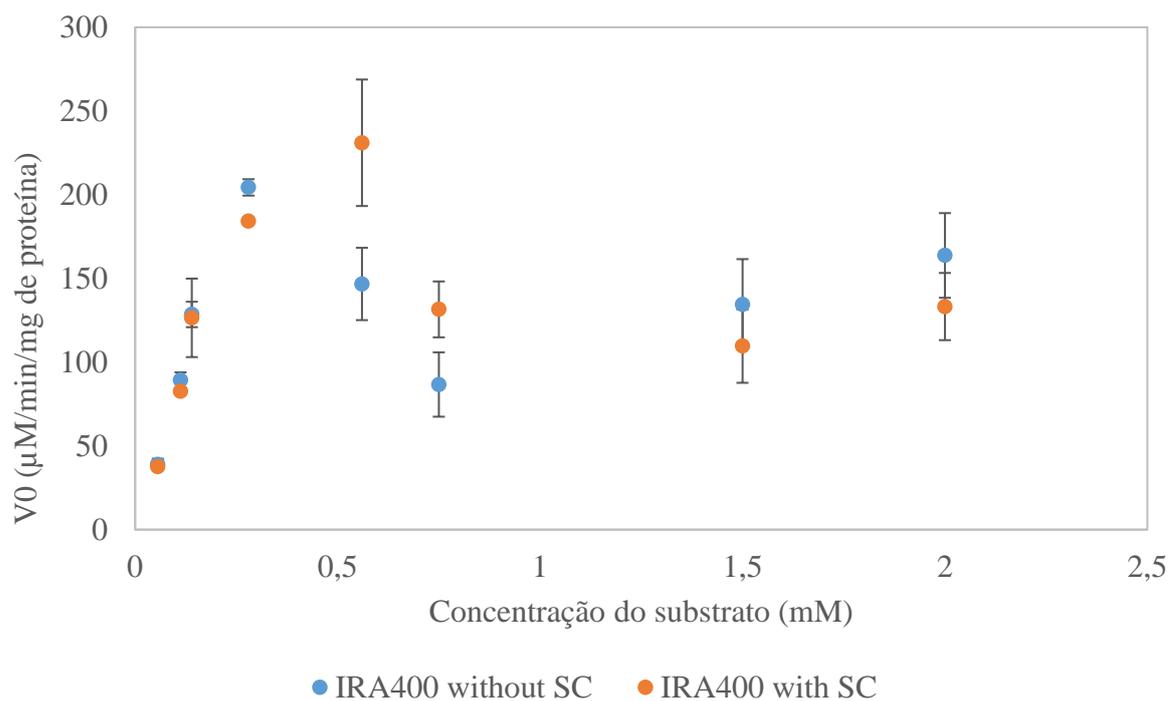


(a)

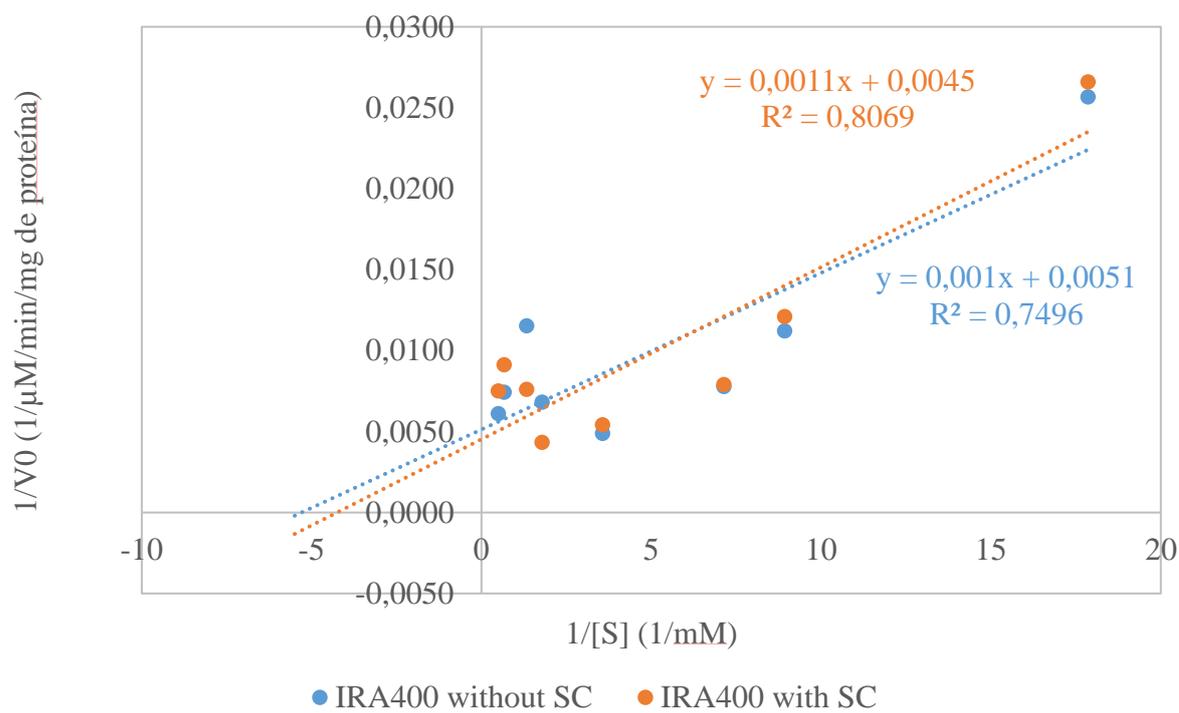


(b)

Figura 17 – (a) Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação de hidrólise do p-NFL catalisada pela Lipase TL 100 L e (b) gráfico de duplo recíproco.

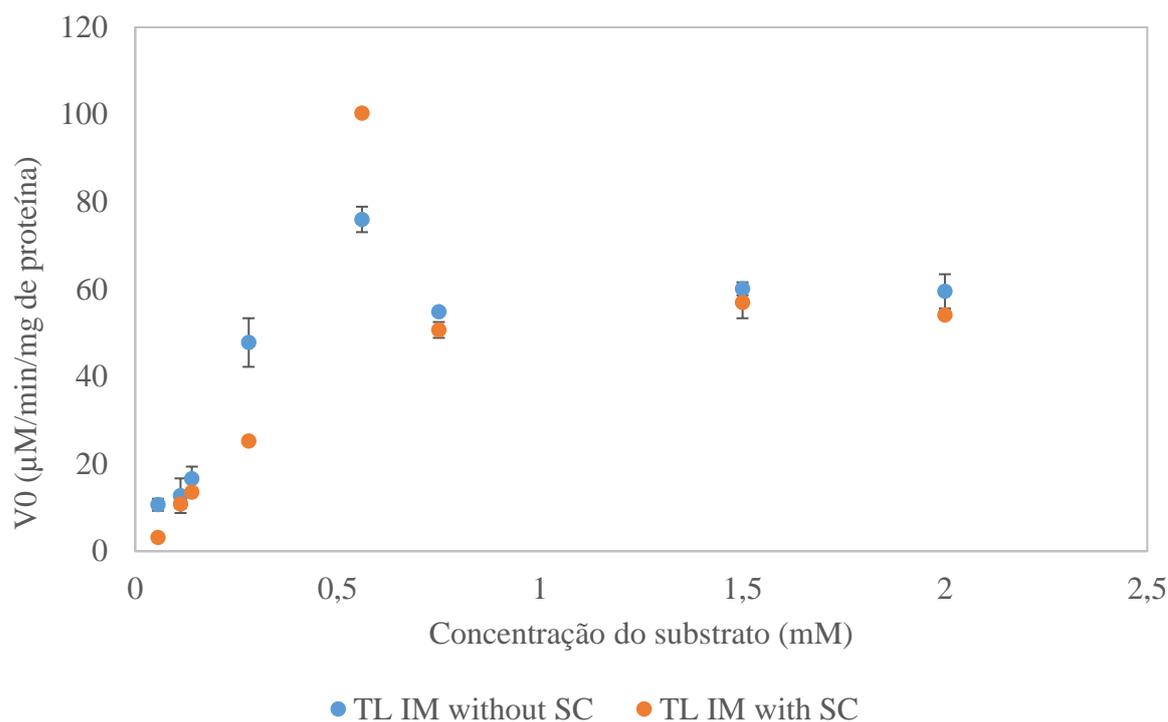


(a)

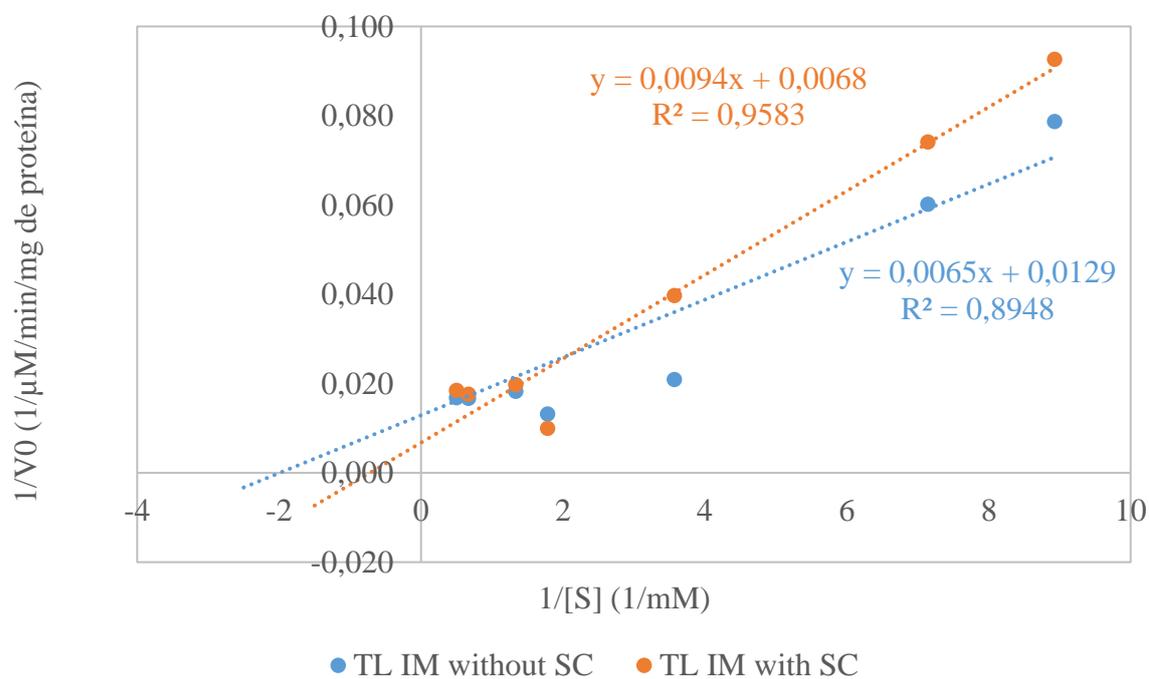


(b)

Figura 18 – (a) Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação de hidrólise do p-NFL catalisada pela TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl^- e (b) gráfico de duplo recíproco.



(a)



(b)

Figura 19 – (a) Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação de hidrólise do p-NFL catalisada pela Lipozyme TL IM e (b) gráfico de duplo recíproco.

O efeito de inibição do substrato utilizando a Lipozyme TL IM como biocatalisador da reação também foi observado por outros autores (SHIN *et al.*, 2012; CHEW *et al.*, 2008). Bansode & Rathod (2019), realizaram um estudo de síntese enzimática do propil acetamida

utilizando a lipase de *Candida antarctica* sob a influência de um ultrassom e foi constatado uma leve inibição pelo produto obtido da síntese estudada. O mesmo fenômeno de inibição sobre a lipase de *C. antarctica* também foi observado por Bezbradica *et al.* (2013). Em 1967, Menger & Portnoy evidenciaram uma inibição por parte do produto, especificamente a uréia, na reação de hidrólise do p-nitrofenil laurato.

A concentração ótima de substrato é observada em torno de 560 μM , onde é possível observar uma velocidade máxima aparente para todas as lipases tanto livre quanto imobilizada, exceto para a TLL imobilizada em Amberlite IRA100 Cl⁻, cuja velocidade máxima é observada ao redor de 280 μM . A Tabela 20 mostra os valores de velocidade máxima aparente para cada amostra analisada.

Tabela 20 – Velocidade máxima aparente obtida para a TLL tanto livre quanto imobilizadas.

Enzima	V_{max} aparente ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Lipozyme TL 100 L	2924 \pm 280
Lipozyme TL IM sem tratamento	76 \pm 3
Lipozyme TL IM com tratamento	100 \pm 3
TLL imobilizada em IRA400 Cl ⁻ sem tratamento	204 \pm 5
TLL imobilizada em IRA400 Cl ⁻ com tratamento	231 \pm 38

Considerando os erros experimentais de atividade, e o erro médio expresso, não foi observado efeito do supercrítico na velocidade máxima do biocatalisador. A elevada redução da velocidade máxima da enzima livre para as imobilizadas se deve, provavelmente, aos efeitos difusionais do substrato no suporte. O suporte Amberlite IRA400 Cl⁻ promoveu menor redução na velocidade possivelmente devido as diferenças estruturais. Análises morfológicas de distribuição de poros poderiam trazer dados que pudesse reforçar essa suposição.

O efeito positivo na velocidade da reação utilizando o CO₂ supercrítico também foi observado utilizando a lipase PS e de *Candida rugosa*, ambas na condição de 100 bar, 40 °C e 0,5 h, com incremento de 60% e 50% sobre a velocidade da reação das mesmas lipases sem o pré-tratamento (LIU *et al.*, 2013a; LIU *et al.*, 2012).

5. CONCLUSÕES

Em relação a etapa de imobilização, conclui-se que o suporte Amberlite IRA 400 Cl⁻ apresentou melhores condições para a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* através da técnica de adsorção iônica. Ao comparar a lipase imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ e com a lipase comercial (Lipozyme TL IM) é possível observar o melhor desempenho da enzima comercial em termos de atividade.

O planejamento experimental mostrou que o dióxido de carbono supercrítico pode ser utilizado para a ativação da TLL imobilizada em Amberlite IRA 400 Cl⁻, tendo em vista os resultados de superativação (>100%) obtidos em diversas amostras submetidas as condições diferentes de temperatura, pressão e tempo de exposição. Todavia, para a Lipozyme TL IM os resultados de atividade residual não foram tão expressivos quando comparado com a lipase imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻. Além disso, o CO₂-SC influenciou negativamente na TLL imobilizada em Amberlite IR120 Na⁺, inativando todas as amostras em qualquer condição de T, P e t, dessa forma esse tipo de suporte não se mostrou adequado para obtenção de derivados que sejam usados em reações com fluidos supercríticos ou usando este como pré-tratamento.

Com base nos resultados de atividade hidrolítica e estabilidade da TLL imobilizada comercial (Lipozyme TL IM) e em Amberlite IR120 Na⁺ e Amberlite IRA400 Cl⁻, comenta-se que a atividade hidrolítica pode ser melhorada pela influência da alta pressão do dióxido de carbono supercrítico. Este resultado, foi observado tanto para a TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ quanto para a Lipozyme TL IM. Por outro lado, é possível afirmar que a temperatura afeta severamente a estabilidade e a atividade hidrolítica da lipase. Além disso, deve-se ter cuidado com a etapa de despressurização, visto que esses fatores podem ocasionar a desnaturação e, portanto, uma completa desativação desta enzima.

Além disso, as características relacionadas a solvatação desse fluido foi confirmada pelas análises de DSC, conferindo estabilidade a essa proteína. Apesar da amostra de TLL imobilizada em Amberlite IRA400 Cl⁻ ter apresentado degradação. Esse resultado reforça que a estabilidade enzimática não depende somente do tipo de enzima, mas sim do conjunto a qual ela se encontra levando em consideração o suporte empregado e as condições operacionais utilizadas. Os espectros de FTIR mostraram que não houve variação entre as amostras sem e com tratamento utilizando o CO₂-SC. Quanto ao efeito da concentração do substrato, concluiu-se que a velocidade de reação máxima das lipases imobilizadas foram interferidas pelo pré-tratamento.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTURO

- Analisar os efeitos de pH sobre a atividade hidrolítica e estabilidade da TLL imobilizada tanto em Amberlite IR120 Na⁺ quanto em Amberlite IRA400 Cl⁻. Além de avaliar o efeito dessas lipases em relação estabilidade à estocagem e operacional.
- Otimizar a etapa de imobilização visando obter um maior número de unidades de lipase por grama de suporte.
- Submeter apenas o suporte Amberlite IRA400 Cl⁻ cru nas mesmas condições de dióxido de carbono supercrítico estudadas, com a finalidade de avaliar o quanto o suporte pode ser afetado. Mais ainda, quantificar essa degradação decorrente do fluido supercrítico para entender qual a contribuição da presença da enzima e do fluido supercrítico sobre este suporte.
- Aplicar o mesmo planejamento experimental da lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em Amberlite IR400 Cl⁻ utilizando o propano supercrítico como pré-tratamento, tendo em vista que em outros estudos esse fluido supercrítico proporcionou elevada atividade residual em outras lipases.
- Analisar morfológicamente as possíveis mudanças na superfície do suporte decorrente do pré-tratamento através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Modelar a curva da velocidade de reação da hidrólise do p-NFL, utilizando a TLL como catalisador e considerando o efeito de inibição do substrato observado nesta dissertação.
- Realizar uma avaliação técnica-econômica da aplicação da TLL imobilizada em IRA400 Cl⁻ pré-tratada para produção de biodiesel, na síntese de compostos aromáticos, entre outras aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-NABY, M. A.; ISMAIL, A-M, S.; AHMED, S. A.; FATTAH, A. F. A. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresource Technology*, v. 64, p. 205-210, 1998
- ADAK, S.; DATTA, S.; BHATTACHARYA, S.; BANERJEE, R. Role of spacer length in interaction between novel gemini imidazolium surfactants and *Rhizopus oryzae* lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 560-567, 2015.
- AEHLE, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. 3ª Edição, Wiley-VCH, 2007.
- ALVES, M. D.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, p. s377-s387, 2016.
- ANDRADE, J. M.; OESTREICHER, E. G.; OVILEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C. Effect of treatment with compressed CO₂ and propane on d-hydantoinase activity. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 46, p. 342-350, 2008.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 7, p. 257-270, 2016.
- ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2148-2156, 2011.
- ANWAR, M. Z.; KIM, D. J.; KUMAR, A.; PATEL, S. K. S.; OTARI, S.; MARDINA, P. JEONG, J. H.; SOHN, J. H.; KIM, J. H.; PARK, J. T.; LEE, J. K. SnO₂ hollow nanotubes: a novel and efficient support matrix for enzyme immobilization. *Nature: Scientific reports*, v.7, p. 1-11, 2017.
- AUCOIN, M. G.; LEGGE, R. L. Effects of supercritical CO₂ exposure and depressurization on immobilized lipase activity. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 1863-1870, 2001.
- AYBASTIER, O.; DEMIR, C. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 63, p. 170-178, 2010.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 122, p. 255-264, 2015.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An intensified technique for lipase catalyzed amide synthesis. *Chemical Engineering and Processing – Process Intensification*, 2019 (accepted manuscript).
- BAUER, CH.; STEINBERGE, D. J.; SCHALAUER, G.; GAMSE, T.; MARR, R. Activation and denaturation of hydrolases in dry and humid supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). *Journal of Supercritical Fluids*, v. 19, p. 79-86, 2000.

BBC. Global markets for enzymes in industrial applications. BBC Research, BIO030J, 2017. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

BEZBRADICA, D.; STOJANOVIĆ, M.; VELIČKOVIĆ, D.; DIMITRIJEVIĆ, A.; CAREVIĆ, M.; MIHAILOVIĆ, M.; MILOSAVIĆ, N. Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester. *Biochemical Engineering Journal*, v. 71, p. 89–96, 2013

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, v. 31, p. 1639-1650, 2009.

BRENA, B.; GONZALEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Methods in Molecular Biology*, v. 1051, p. 15-31, 2013.

BRÍGIDA, A. I. S. Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais. Rio de Janeiro, p. 1-220. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 2010.

BROCCA, S.; SECUNDO, F.; OSSOLA, M.; ALBERGHINA, L.; CARREA, G.; LOTTI, M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *C. rugosa* lipase isozymes. *Protein Science*, v. 12, p. 2312-2319, 2003.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, v. 67, p. 21-33, 2005.

BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, G. G.; LAWSON, D. M.; TURKENBURG, J. P.; BJORKKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S. A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, v. 351, p. 491-494, 1991.

CAO, C.; MATSUDA, T. Biocatalysis in Organic Solvents, Supercritical Fluids and Ionic Liquids. In: GOSWAMI, A.; STEWART, J. D., editors. *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. Elsevier, 2015, p. 67-97.

CARVALHO, A. C.; FONSECA, T. S.; MATTOS, M. C.; DE OLIVEIRA, M. C.; LEMOS, T. L.; MOLINARI, F.; ROMANO, D. SERRA, I. Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 29682-29716, 2015.

CARVALHO, N. B.; SILVA, M. A. O.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; DARIVA, C.; ZANIN, G. M.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Evaluation of activity of *Bacillus* lipase (free and immobilized) treated with compressed propane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 99, p. 130-135, 2014.

CELIA, H.; CERNIA, E.; PALOCCI, C.; SORO, S.; TURCHET, T. Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluid*, v. 33, p. 193-199, 2005.

CERNIA, E.; PALOCCI, C. Lipases in Supercritical Fluids. KAZLAUSKAS, R. *Methods in Enzymology*, v.286, San Diego, Academic Press, 1997, cap. 23, p. 495-508.

CHAUDHURI, A.; BHARADWAJ, G.; MAHESHWARI, R. An unusual pattern of invertase activity development in the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 177, p. 39-45, 1999.

CHEN, D.; PENG, C.; ZHANG, H.; YAN, Y. Assessment of Activities and Conformation of Lipases Treated with Sub- and Supercritical Carbon Dioxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, p. 2189-2201, 2013a.

CHEN, D.; ZHANG, H.; XU, J.; YAN, Y. Effect of sub- and supercritical CO₂ treatment on the properties of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 53, p. 110-117, 2013b.

CHENG, M.; ANGKAWIDJAJA, C.; KOGA, Y.; KANAYA, S. Requirement of lid2 for interfacial activation of a family I.3 lipase with unique two lid structures. *The FEBS Journal*. v. 279, p. 3727–3737, 2012.

CHEW, Y. H.; CHUA, L. S.; CHENG, K. K.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. A.; LEE, C. T. Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 516–520, 2008.

CHIES, V. Indústrias investem na biotecnologia. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 28 set. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/28622890/industrias-investem-na-biotecnologia>>. Acesso em: 01 Ago. 2018

CHIOU, S. H.; WU, W. T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, v. 25, p. 197-204, 2004.

CHOI, M. F. M. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchim Acta*, v. 148, p. 107–32, 2004.

COLLINS, S. E.; LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L.; FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, p. 220-228, 2011.

CORTINA, J. L.; MIRALLES, N.; AGUILAR, M.; STASTRE, A. M. Extraction studies of Zn (II), Cu (II) and Cd (II) with impregnated and Levextrel resins containing di (2-ethylhexyl) phosphoric acid (Lewatit 1026). *Hydrometallurgy*, v. 36, p. 131–142, 1994.

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

DE DIEGO, T.; LOZANO, P.; GMOUH, S.; VAUTIER, M.; IBORRA, J. L. Understanding structure–stability relationships on *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Biomacromolecules*, v. 6, p. 1457-1464, 2005.

DHAKE, K. P.; DESHMUKH, K. M.; PATIL, Y. P.; SINGHAL, R. S.; BHANAGE, B. M. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *Journal of Biotechnology*, v. 156, p. 46–51, 2011.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production and Immobilization of Lipase from *Aeromonas sobria* Harboring a Heterologous Gene. *Journal of fermentation and bioengineering*, v. 86, p. 335-337, 1998.

DIAS, A. L. B.; SANTOS, P.; MARTÍNEZ, J. Supercritical CO₂ technology applied to the production of flavor ester compounds through lipase-catalyzed reaction: A review. *Journal of CO₂ Utilization*, v. 23, p. 159-178, 2018.

DJORDJEVIC, D. M.; PETRONJEVIC, Z. B.; CVETKOVIC, D. M. Polyester fabric modification by some lipases. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, v. 11, p. 183-188, 2005.

DOS SANTOS, P.; RENZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 107, p.170-178, 2016.

DUMORNÉ, K.; CÓRDOVA, D. C.; ASTORGA-ELÓ, M.; RENGANATHAN, P. Extremozymes: A potential source for industrial applications, *J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2017) 649–659. doi:10.4014/jmb.1611.11006

DUPONT, J.; DE SOUZA, R. F.; SUAREZ, A. Z. Ionic liquids (molten salts) phase organometallic catalysis. *Chemical Reviews*, v. 102, p. 3667-3692, 2002.

EARLE, M. J.; PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. Green synthesis of biodiesel using ionic liquids. *Pure and Applied Chemistry*, v. 81, p. 2045-2057, 2009.

ECKSTEIN, M.; WASSERCHEID, P.; KRAGL, U. Enhanced enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas* sp. at high temperatures and fixed water activity in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulphonyl]amide, *Biotechnology Letters*, v. 24, p. 763-767, 2002.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 331-347, 2009.

EL-HENNAWI, H. M.; SHAHIN, A. A.; REKABY, M.; RAGHEB, A. A. Ink jet printing of bio-treated linen, polyester fabrics and their blend. *Carbohydrate Polymers*, v. 118, p. 235-241, 2015.

EMERSON, R. Thermophiles. In: ANSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S., editors. *The Fungi. An Advanced Treatise*. Academic Press, London, p. 105-128, 1968.

EMREGUL, E.; SUNGUR, S.; AKBULUT, U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. *Food Chemistry*, v. 97, p. 591-597, 2006.

ENGINEERING TOOLBOX. Carbon Dioxide - Thermophysical Properties. 2018. Disponível em: <https://www.engineeringtoolbox.com/CO2-carbon-dioxide-properties-d_2017.html>. Acesso em 19 de maio de 2019.

FAIGL, F.; THURNER, A.; FARKAS, F.; BATTANCS, M.; POPPE, L. Synthesis and enantioselective rearrangement of (Z)-4-triphenylmethoxy-2,3- epoxybutan-1-ol enantiomers. *Chirality*, v. 19, p. 197–202, 2007.

- FAN, Y.; QIAN, J. Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 1-7, 2010.
- FEHER, E.; MAJOR, B.; BELAFI-BAKO, K.; GUBICZA, L. On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p. 1624-1627, 2007.
- FERNANDES, P. *Enzymatic Processing in the Food Industry. Reference Module in Food Science*, 2018.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 197-212, 2010.
- FRANKEN, L. P. G.; MARCON, N. S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. Effect of Treatment with Compressed Propane on Lipases Hydrolytic Activity. *Food Bioprocess Technology*, v. 3, p. 511-520, 2010.
- GARCIA, S. M. P. *Biocatálise em meios não convencionais: solventes orgânicos, fluidos supercríticos e líquidos iônicos*. Lisboa, p.1-136. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2005.
- GISSAUF, A.; MAGOR, W.; STEINBERGER, D. J.; MARR, R. A study of hydrolases stability in supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 577-583, 1999.
- GOTTOR, V. Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. *Organic Process Research & Development*, v. 6, p. 420-426, 2002.
- GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 37, p. 63-71, 2003.
- HEIKINHEIMO, P.; GOLDMAN, A.; JEFFRIES, C.; OLLIS, D. L. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure*, v. 7, p. R141–R146, 1999.
- HJORTH, A.; CARRIERE, F.; CUDREY, C.; WOLDIKE, H.; BOEL, E.; LAWSON, D. M.; FERRATO, F.; CAMBILLAU, C.; DODSON, G. G.; THIM, L. A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho) lipase. *Biochemistry*, v. 32, p. 4702–4707, 1993.
- HU, W.; ZHOU, L.; XU, Z.; ZHANG, Y.; LIAO, X. Enzyme Inactivation in Food Processing using High Pressure Carbon Dioxide Technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, p. 145–161, 2013.
- ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G. R. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 48-57, 2012.
- JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase - a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, p. 253-264, 2008.

JURADO, E.; BRAVO, V.; LUZÓN, G.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; GARCÍA-ROMÁN, M.; ALTMAJER-VAZ, D.; VICARIA, J. M. Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme-Surfactant Interactions and Washing Tests. *Journal of Surfactants Detergents*, v. 10, p. 61-70, 2007.

KALSI, P. S. *Spectroscopy of Organic Compounds*, 2nd ed., New Age International Limited, India, 1995.

KANTOUCH, A.; RASLAN, W. M.; EL-SAYED, H. J. Effect of Lipase Pretreatment on the Dyeability of Wool Fabric. *Journal of Natural Fibers*, v. 2, p. 35-48, 2005.

KAO, F. J.; EKHORYTOMWEN, S. A.; SAWAN, S. P. Residual stability of lipase from *Candida rugosa* in hexane, supercritical CO₂, and supercritical SF₆. *Biotechnology Techniques*, v. 11, p. 849-852, 1997.

KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic-solvents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 501, p. 129-129, 1987.

KNEZ, Z.; HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: A short review. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 23, p. 29-34, 2002.

KNEZ, Z. Enzymatic reactions in dense gases. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 357-372, 2009.

KNEZ, Z. Enzymatic reactions in subcritical and supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 134, p. 133-140, 2018.

KNEZEVIC, Z. D.; SILER-MARINKOVIC, S. S.; MOJOVIC, L. V. Immobilized lipases as practical catalysts. *APTEFF*, v. 35, p. 151-164, 2004.

KOSHIYAMA, I.; HAMANO, M.; FUKUSHIMA, D. A heat denaturation study of the 11S globulin in soybean seeds. *Food Chemistry*, v. 6, p. 309-322, 1981.

KRISHNA, S. H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 193-201, 2001.

KUHN, G. O.; COGHETTO, C.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2286-2290, 2011.

KUMAR, S. K.; MANIMARAN, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.107, p. 494-498, 2009.

KUMAR, R. R.; SREELATHA B.; GIRISHAM, S.; REDDY, S. M. Incidence of thermophilic fungi from different substrates in Andhra Pradesh (India). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 1, p. 1-6, 2010.

KUMAR, M.; MUKHERJEE, J.; SINHA, M.; KAUR, P.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N.; SINGH, T. P. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning

(TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Sustainable Chemical Processes*, v. 3, p. 1-10, 2015.

LANZA, M.; PRIAMO, W. L.; OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; DE OLIVEIRA, D. The Effect of Temperature, Pressure, Exposure Time, and Depressurization Rate on Lipase Activity in SCCO₂. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 181-187, 2004.

LI, C.; GUOCHENG, D.; DONGXU, Z.; JIAN, C. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3794-3800, 2008.

LI, N.; ZONG, M. H.; MA, D. Unexpected reversal of the regioselectivity in *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed acylation of floxuridine. *Biotechnology Letter*, v. 31, p. 1241-1244, 2009.

LI, L.; FREY, M.; BROWNING, K. J. Biodegradability study on cotton and polyester fabrics. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, v. 5, p. 42-53, 2010.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 2, p. 1-11, 2012.

LI-CHAN, E. C. Y.; MA, C. Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, v. 77, p. 495-502, 2002.

LIU, Y.; CHEN, D.; XU, L.; YAN, Y. Evaluation of structure and hydrolysis activity of *Candida rugosa* Lip7 in presence of sub-/super-critical CO₂. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 51, p.324-358, 2012.

LIU, Y.; CHEN, D.; WANG, S. Effect of sub- and super-critical CO₂ pretreatment on conformation and catalytic properties evaluation of two commercial enzymes of CALB and Lipase PS. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 88, p. 1750-1756, 2013.

LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, p. 332-342, 2018.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS-FARR, A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; CARRI'E, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Overstabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis, *Biotechnology Letters*, v. 23, p.1529-1533, 2001.

LOZANO, P.; VILLORA, G.; GÓMEZ, D.; GAYO, A. B.; SÁNCHEZ-CONESA, J. A.; RUBIO, M.; IBORRA, J. L. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 29, p. 121-128, 2004.

LYBERG, A. M.; ADLERCREUTZ, P. Lipase specificity towards eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid depends on substrate structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1784, p. 343-350, 2008.

MAKOLOMAKWA, M.; PURI, K. A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Thermo-acid-stable phytase-mediated enhancement of bioethanol production using *Colocasia esculenta*. *Bioresource Technology*, v. 235, p. 396-404, 2017.

MARTINS, A. B.; FRIEDRICH, J. L. R.; CAVALHEIRO, J. C.; GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. 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.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE G.; GUIBAN J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATIJOŠYTE, I.; ARENDS, I.; DE VRIES, S.; SHELDON, R. A. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 142-914, 2010.

MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Physical-Chemical Properties of the Support Immobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, p. 1430-1439, 2017.

MELGOSA, R.; SANZ, M. T.; SOLAESA, A. G.; BUCIO S. L.; BELTRÁN, S. Enzymatic activity and conformational and morphological studies of four commercial lipases treated with supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 97, p.51-62, 2015.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011.

MENGER, F. M.; PORTNOY, C. E. The effect of urea and other reagents on the reactivity of associated p-nitrophenyl laurate. *Journal of the American Chemical Society*, v. 90, p. 1875–1878, 1968.

MERTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1258, p. 272–276, 1995.

MONHEMI, H.; HOUSAINDOKHT, M. R. Chemical modification of biocatalyst for function in supercritical CO₂: In silico redesign of stable lipase. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 117, p. 147-163, 2016.

MUKHERJEE, J.; GUPTA, M. N. Dual bioimprinting of *Thermomyces lanuginosus* lipase for synthesis of biodiesel. *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 38-43, 2016.

NAKAMURA, K.; TAKEBE, Y.; KITAYMA, T.; OHNO, A. Effect of solvent structure on enantioselectivity of lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron Letters*, v. 32, p. 4941-4944, 1991.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 9, p. 732–737, 1999.

NGUYEN, Q. D.; BUJNA, E.; HOSCHKE, A.; SZABO, R. J. M. Thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: Current review on potential source for thermostable enzymes, In: GUPTA, V. K.; AYYACHAMY, M.; editors. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Nova Science Publishers Inc., New York, p. 21-55, 2012.

NOEL, M.; COMBS, D. *Rhizomucor miehei* lipase: differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. *Enzyme Microbial. Technology*, v. 33, p. 299–308, 2003.

NOGUEIRA, F. S.; MIMURA, A. M. S.; SILVA, J. C. J.; SOUSA, R. A. Potencialidade de uso da resina Amberlite IR120 no tratamento de resíduos químicos contendo espécies iônicas com CR2O7²⁻, Fe³⁺ e MnO4⁻. *Eclética Química*, v. 39, p. 12-21, 2014.

NOVOZYMES. Immobilized lipases for biocatalysis for smarter chemical synthesis. No. 2014-12576-04. Bagsvaerd Denmark, 2016a. 6 p.

NOVOZYMES. Lipases for biocatalysis for smarter chemical synthesis. No. 2014-12478-04. Bagsvaerd Denmark, 2016b. 6 p.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 373-382, 2006.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*, v. 5, p. 197–211, 1992.

PLEISS, J.; FISHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the sessile fatty acid binding site. *Chemistry Physics lipids*, v. 93, p. 67-80, 1998.

PORSGAARD, T.; XU, X.; GÖTTSCHE, J.; MU, H. Differences in the intramolecular structure of structured oils do not affect pancreatic lipase activity in vitro or the absorption by rats of (n-3) fatty acids. *Journal of Nutrition*, v. 135, p. 1705-1711, 2005.

PRESAD, A. K.; KALRA, N.; YADAV, Y.; KUMAR, R.; SHARMA, S. K.; PATKAR, S.; LANGE, L.; WENGEL, J.; PARMAR, V. Deacylation studies on furanose triesters using an immobilized lipase: Synthesis of a key precursor for bicyclonucleosides. *Chemical Communications*, p. 2616-2617, 2007.

PRICE, J.; NORDBLAD, M.; MARTEL H. H.; CHRABAS, B.; WANG, H.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. *Biotechnology And Bioengineering*, v. 113, p.1719-1728, 2016.

PUCHART, V.; VRSANSKA, M.; SVOBODA, P.; POHL, J.; OGEL, Z. B.; BIELY, P. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1674, p. 239-250, 2004.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 162, p. 87-106, 2011.

REICHARDT, C.; UTGENANNT, S.; STAHMANN, K. P.; KLEPEL, O.; BARIG, S. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material. *Biochemical Engineering Journal*, v. 138, p. 63-73, 2018.

REISENBERG, M.; SINGH, P. K.; WILLIAMS, G.; DOHERTY, P. The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 367, p. 3264–3275, 2012.

RICH, J. O.; MOZHAEV, V.; DORDICK, J.; DOUGLAS, C.; KHMELNITSKY, Y. L. Molecular imprinting of enzymes with water-insoluble ligands for non aqueous biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, p. 5254-5255, 2002.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D. D.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. D. Application of Different Lipases as Pretreatment in Anaerobic Treatment of Wastewater *Environmental Engineering Science*, v. 25, p. 1243-1248, 2008.

ROHM AND HAAS COMPANY. Product Data Sheet. AMBERLITE® IRA400 Cl-Strong Base Anion Exchanger. IE-553EDS. 2005. 2p.

ROMERO, M. D.; CALVO L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H. S. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 42-48, 2005.

SANTOS, P.; REZENDE, C.; MARTÍNEZ, J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 107, p. 170–178, 2016.

SELLEK, G. A.; CHAUFHURI, J. B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 471-482, 1999.

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

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-14, 2014.

SHIN, S.K.; SIM, J.E.; KISHIMURA, H.; CHUN, B.-S. Characteristics of menhaden oil ethanolysis by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 18, p. 546–550, 2012.

SIMAS, A. S. L. Produção de Biodiesel a partir de óleos vegetais virgens e usados, comparando transesterificação básica e enzimática. Lisboa, p. 1-146. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2008.

SIVALINGAM, G.; MADRAS, G. Dynamics of lipase catalyzed enzymatic degradation of poly(bisphenol-A carbonate). *Journal Applied Polymer Science*, v. 91, p. 2391-2396, 2004.

SMITH, B. *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*. CRC Press, USA, 1999.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. *Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química*, 7a Ed., LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 2007.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A. S.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. . Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 113, p. 307-319, 2004.

SONG, C. E. Enantioselective chemo- and bio-catalysis in ionic liquids. Journal of chemical communications, v. 9, p. 1033-1043, 2004.

SPINELLI, S.; FATARELLA, E.; DI MICHELE, A.; POGNI, R. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. Process Biochemistry, v. 48, p. 218-223, 2013.

SREELATHA, B.; SHANTHI, P. A.; GIRISHAM, S. Incidence of thermophilic fungi in different dung samples of Warangal district of AP. International Journal of Pharma and Bio Sciences, v. 3, p. 355–359, 2013.

TALBERT, J. N.; GODDART, J. M. Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 93, p. 8-19, 2012

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. Biotechnology Advances, v. 28, p. 628-634, 2010.

TAO, M.; LI, Q.; QU, J.; ZHANG, M. Enzymatic synthesis of dipalmitin in supercritical carbon dioxide and mechanism study. Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 52, p. 13528–13535, 2013.

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. International Journal of Scientific and Engineering Research, v.3, p. 1-29, 2012.

THE DOW CHEMICAL COMPANY. Product Data Sheet. AMBERLITE™ IRC120 Na Ion Exchange Resin. No. 177-03802. Rev. 1. 2018. 3 p.

THIRSTRUP, K.; VERGER, R.; CARRIERE, F. Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. Biochemistry, v. 33, p. 2748–2756, 1994.

TOLEDO, L.; RIVAS, B. L.; URBANO, B. F.; SÁNCHEZ, J. Novel N-methyl-D-glucamine-based watersoluble polymer and its potential application in the removal of arsenic. Separation and Purification Technology, v. 103, p. 1-7, 2013.

TRABOULSI, A.; DUPUY, N.; REBUFA, C.; SERGENT, M.; LABED, V. Investigation of gamma radiation effect on the anion exchange resin Amberlite IRA-400 in hydroxide form by Fourier transformed infrared and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopies. Analytica Chimica Acta, v. 717, p. 110-121, 2012.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. Food Bioprocess Technology, v. 3, p. 182-196, 2010.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. Structure, v. 2, p. 293-308, 1994.

URBANO, B. F.; VILLENAS, I.; RIVAS, B. L.; CAMPOS, C. H.; Cationic polymer-TiO₂ nanocomposite sorbent for arsenate removal. Chemical Engineering Journal, v. 268, p. 362-370, 2015.

VARANDAS, V. S.; FERREIRA, R. D. M.; CAVALCANTE, P. A. W.; OLIVEIRA, T. S.; COELHO, D. F.; RODRIGUES, J. R. S.; FREITAS, J. A.; SOUZA, R. R. Imobilização de lipase de *Candida rugosa* em suporte de quitosana por ligação covalente. *Scientia Plena*, v. 14, p. 1-7, 2018.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.

VILLENEUVE, P.; BAROUH, N.; BARÉA, B.; PIOMBO, G.; FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; TURON, F.; PINA, M.; LAGO, R. C. A. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1443-1452, 2007.

WEINGÄRTNER, H.; FRANCK, E. U. Supercritical water as a solvent. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 44, p. 2672–2692, 2005.

WENDHAUSEN, P. A. P.; RODRIGUES G. V.; MARCHETTO O. Apostila de Análises Térmicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Mecânica, 2002.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling, *Chemical Engineering Science*, v. 59, p. 373-383, 2004.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 3194-3201, 1988.

ZHANG, Z.; KUIJER, R.; BULSTRA, S. K.; GRIJPMMA, D. W.; FEIJEN, J. The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate). *Biomaterials*, v. 27, p. 1741-1748, 2006.

ZHANG, D. H.; LI, C.; ZHI, G. Y. Kinetic and thermodynamic investigation of enzymatic l-ascorbyl acetate synthesis. *Journal of Biotechnology*, v. 168, p. 416-420, 2013.

ZHAO, H.; SONG, Z.; OLUBAJO, O.; COWINS, J. V. New ether-functionalized ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, p. 13-23, 2010.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHOU, Z.; INAVAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 154, p. 133-141, 2012.

ZHU, K., JUTILA, A., TUOMINEN, E.K.J., PATKAR, S. A., SVENDSEN, A., KINNUNEN, P.K.J. Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1547, p. 329-338, 2001.

ANEXO A – CURVA PADRÃO DE ALBUMINA DE SORO BOVINO

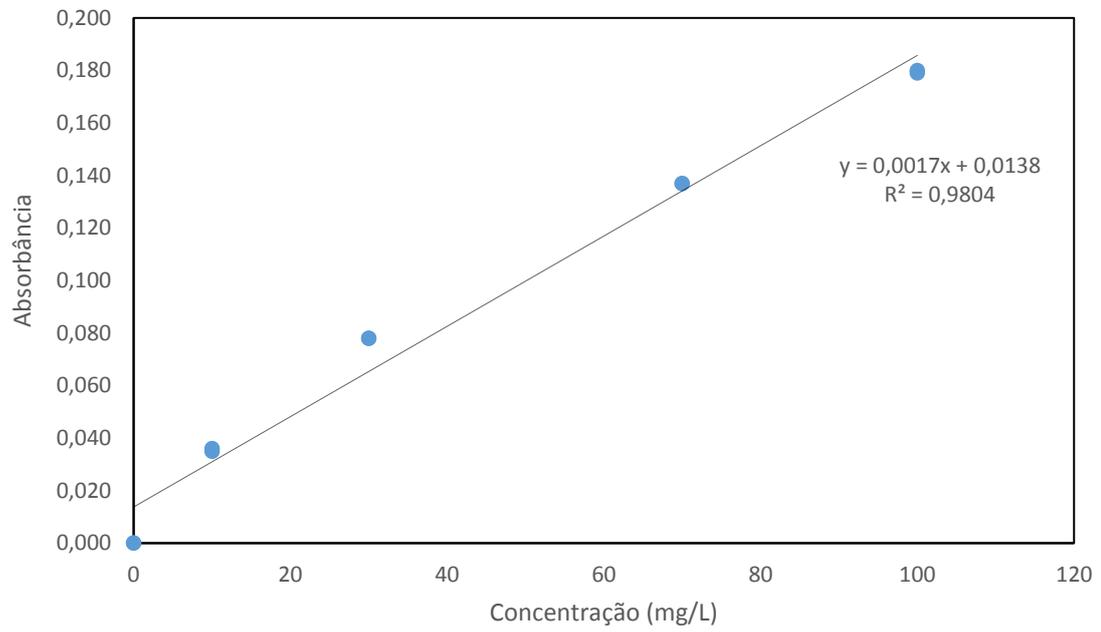
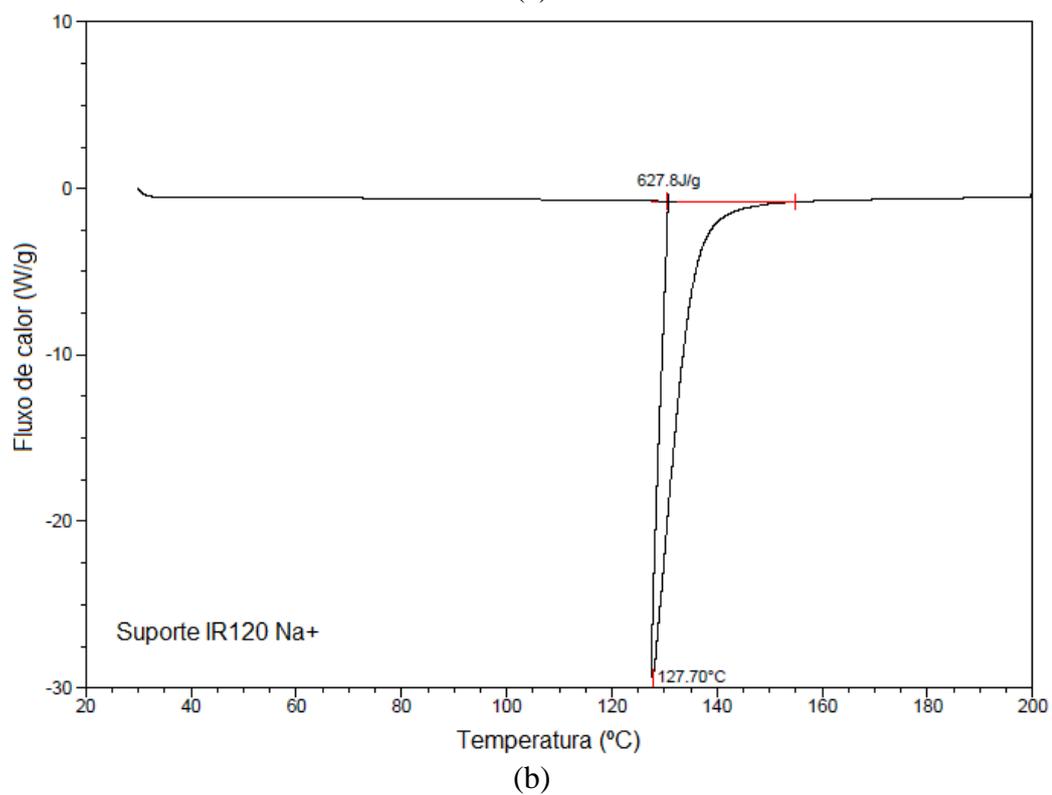
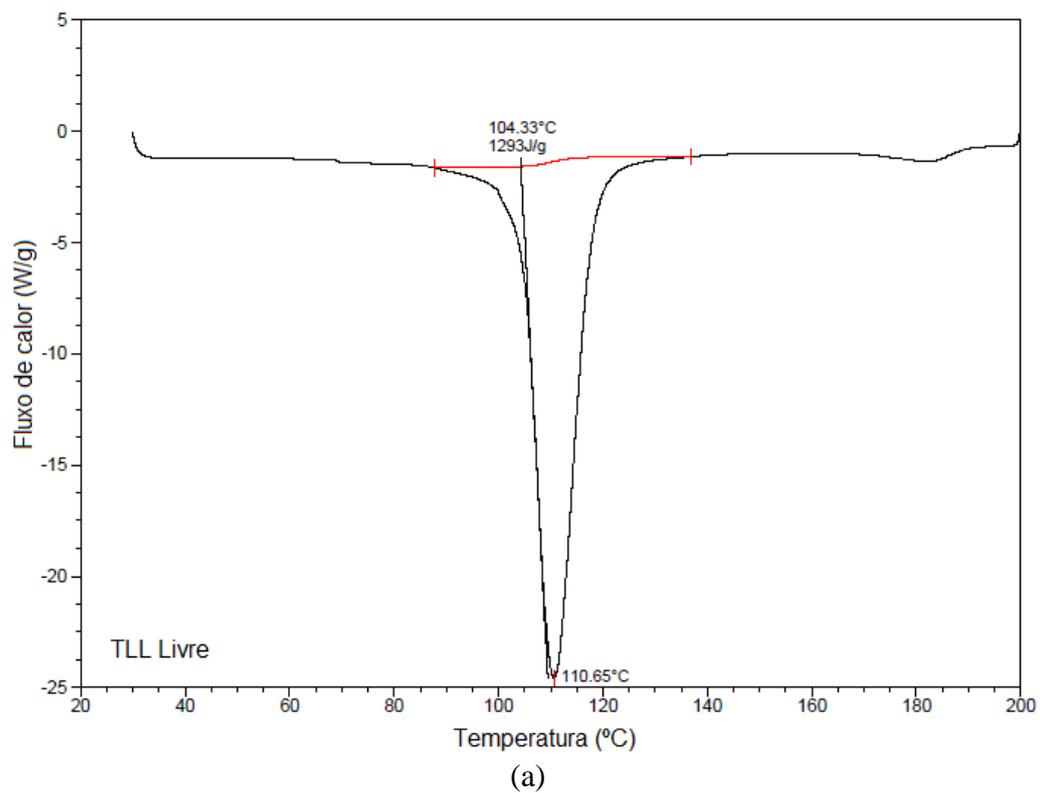
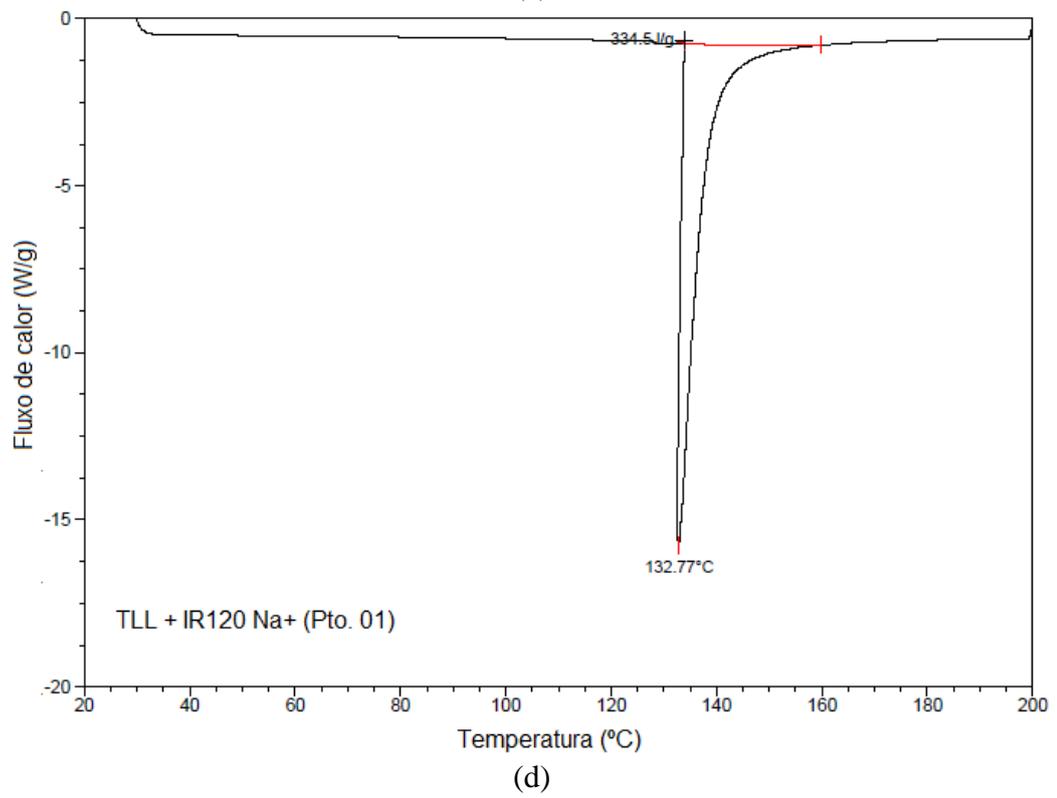
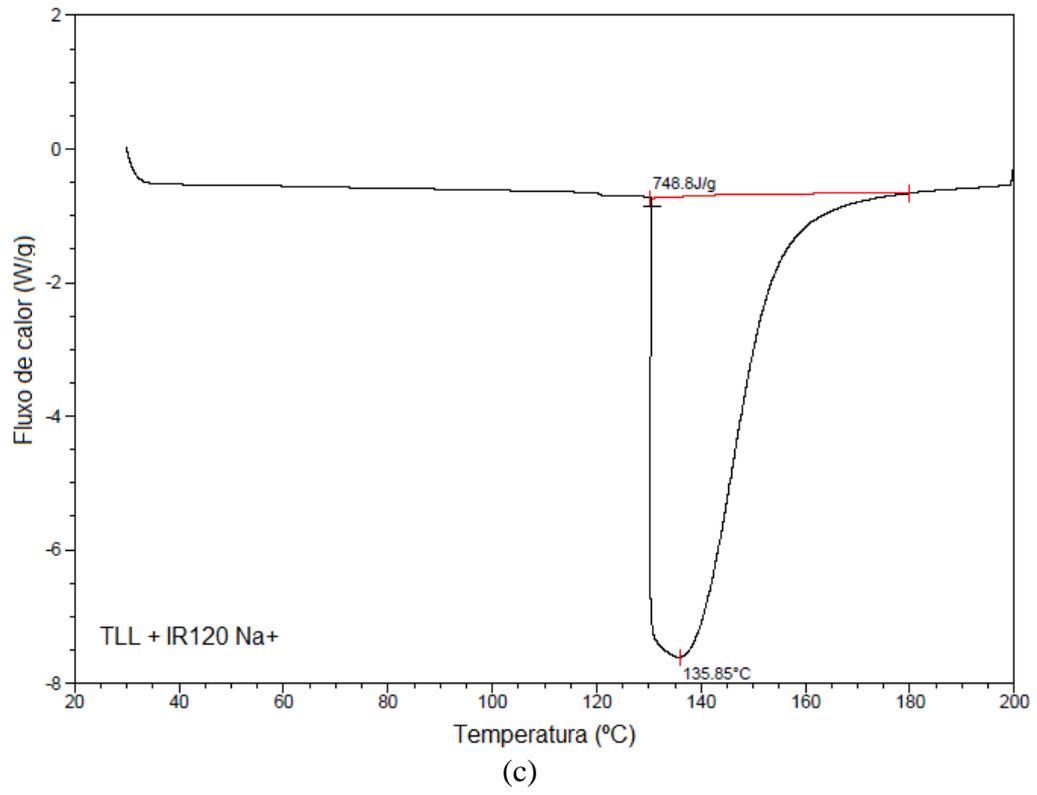
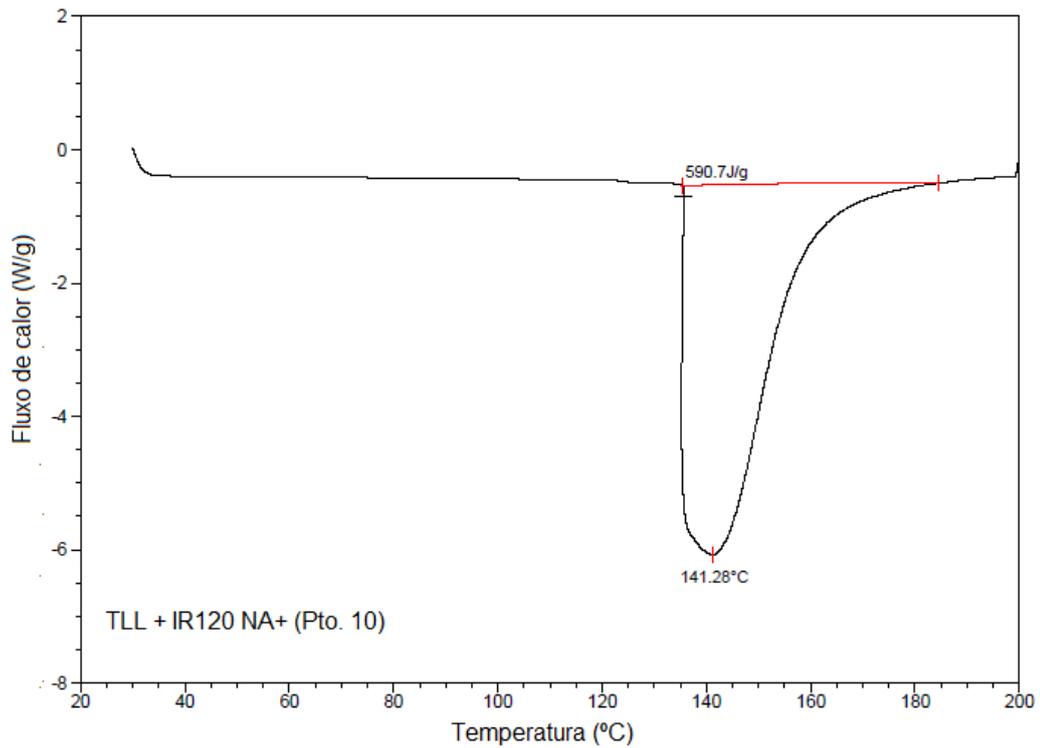


Figura A1 - Curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) para dosagem de proteína.

APÊNDICE A – CURVAS DE DSC REFERENTE A TLL IMOBILIZADA EM AMBERLITE IR120 Na⁺



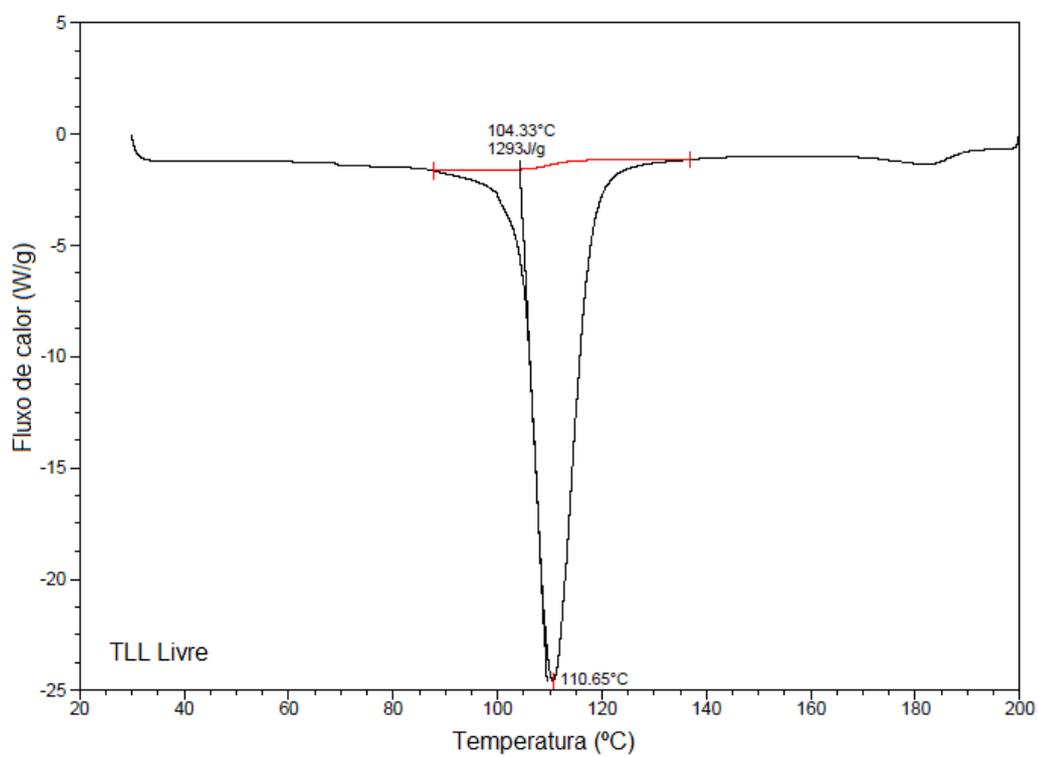




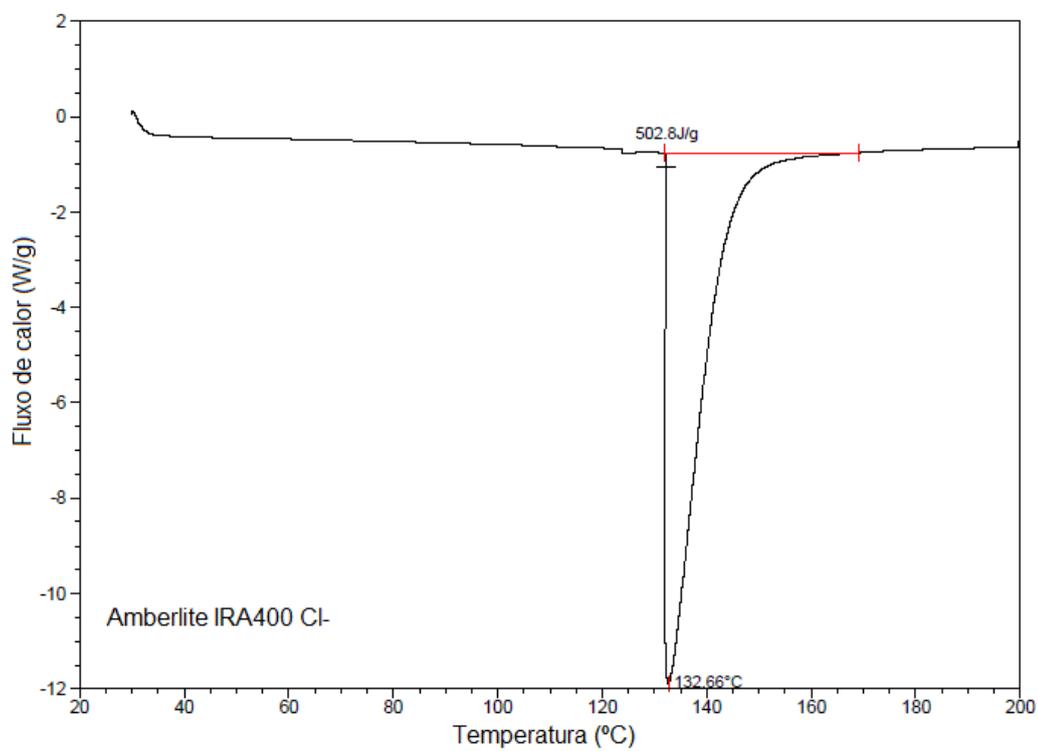
(e)

Figura A2 - Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) obtidas para determinação das temperaturas de fusão e entalpia das amostras referente ao suporte Amberlite IR120 Na⁺. (a) TLL livre, (b) Amberlite IR120 Na⁺, (c) TLL + Amberlite IR120 Na⁺, (d) TLL + Amberlite IR120 Na⁺ experimento 1, (e) TLL + Amberlite IR120 Na⁺ experimento 10.

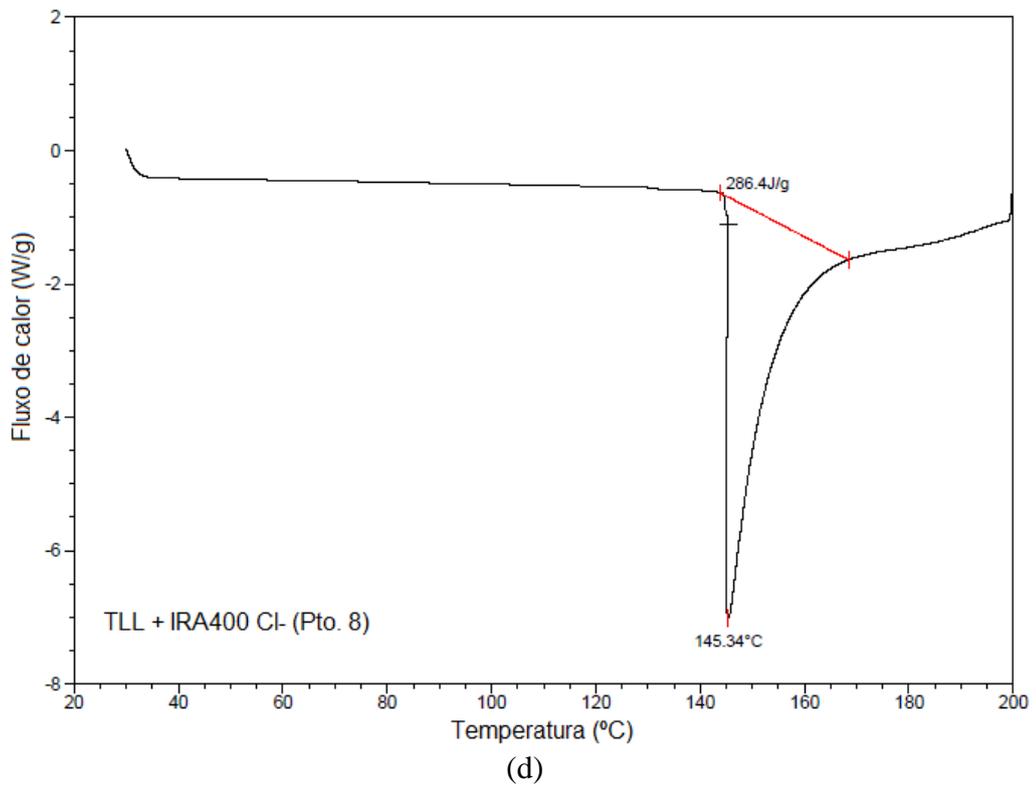
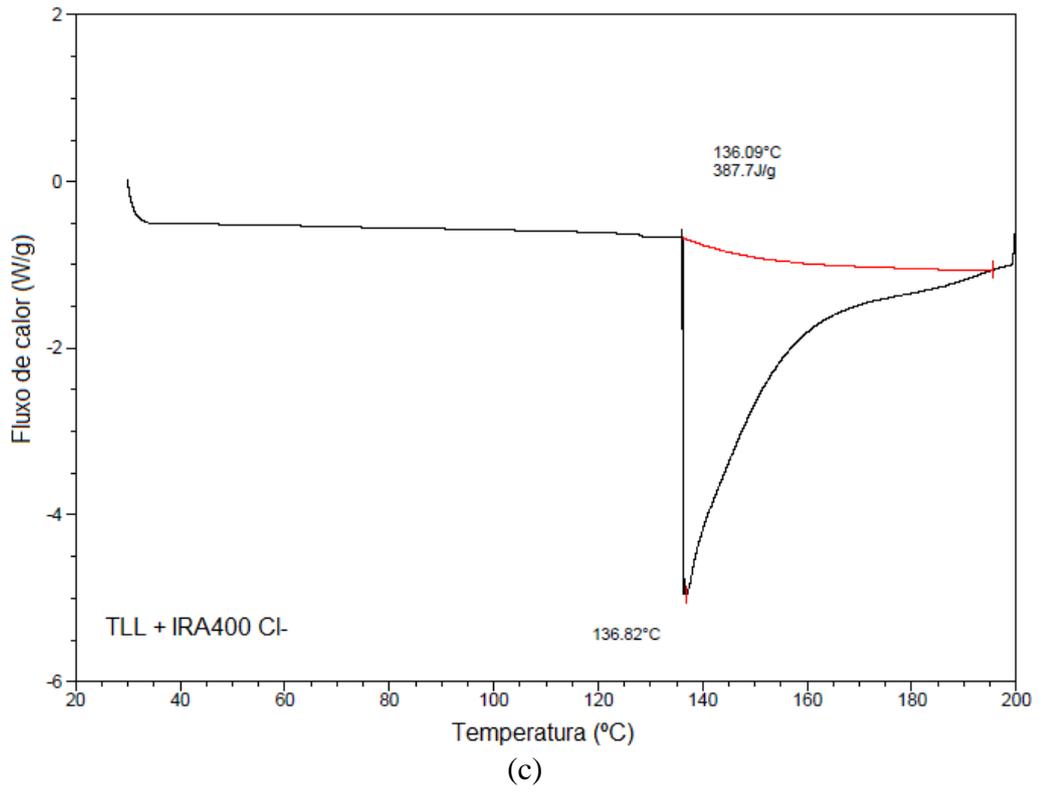
APÊNDICE B – CURVAS DE DSC REFERENTE A TLL IMOBILIZADA EM AMBERLITE IRA400 Cl⁻

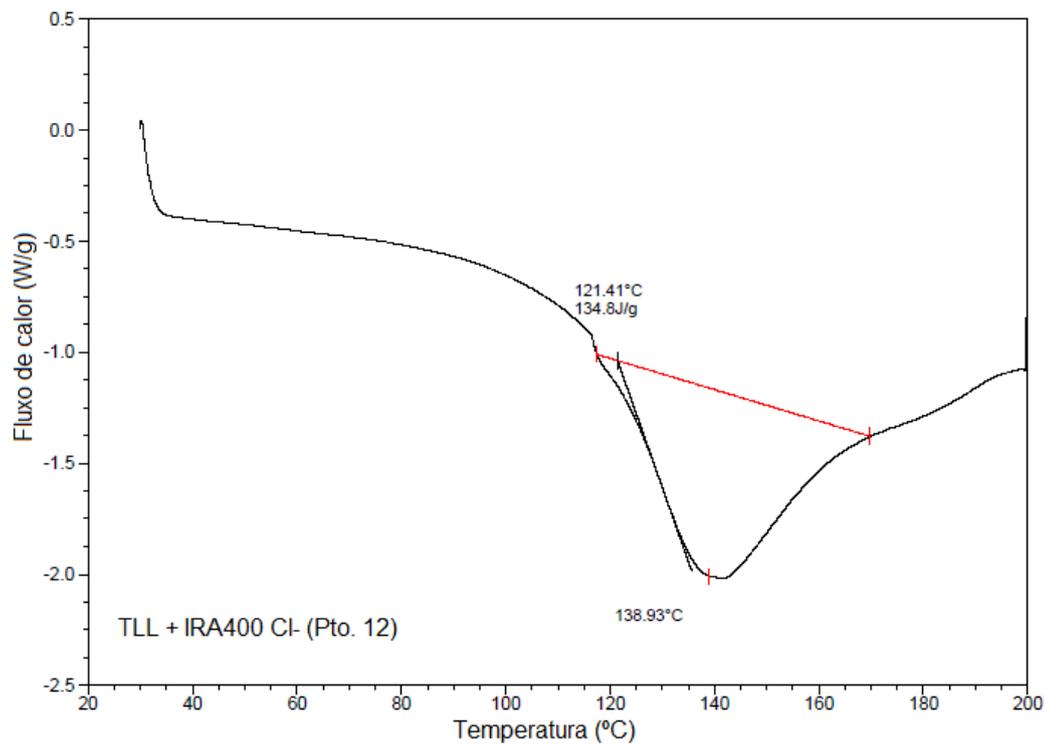


(a)

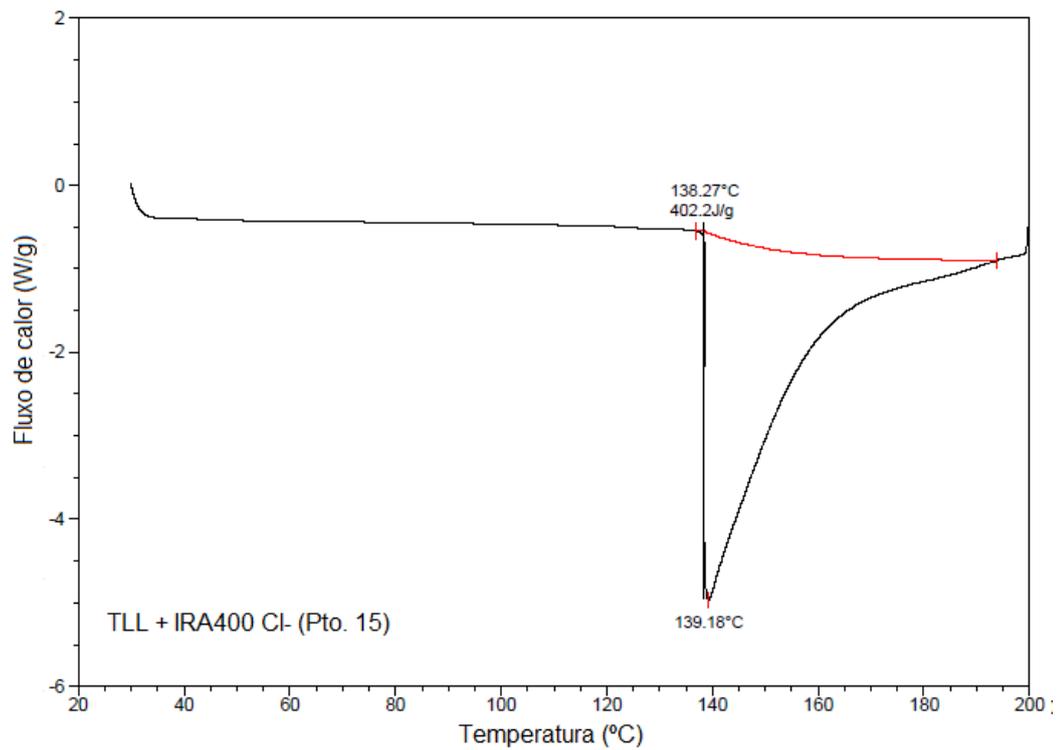


(b)





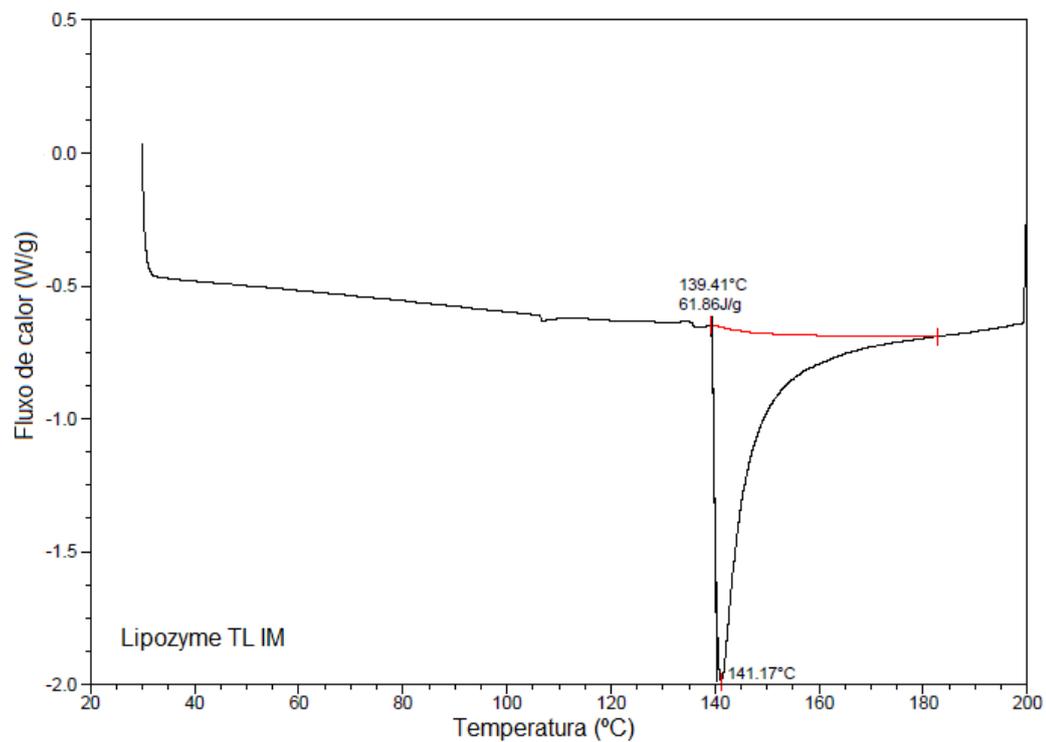
(e)



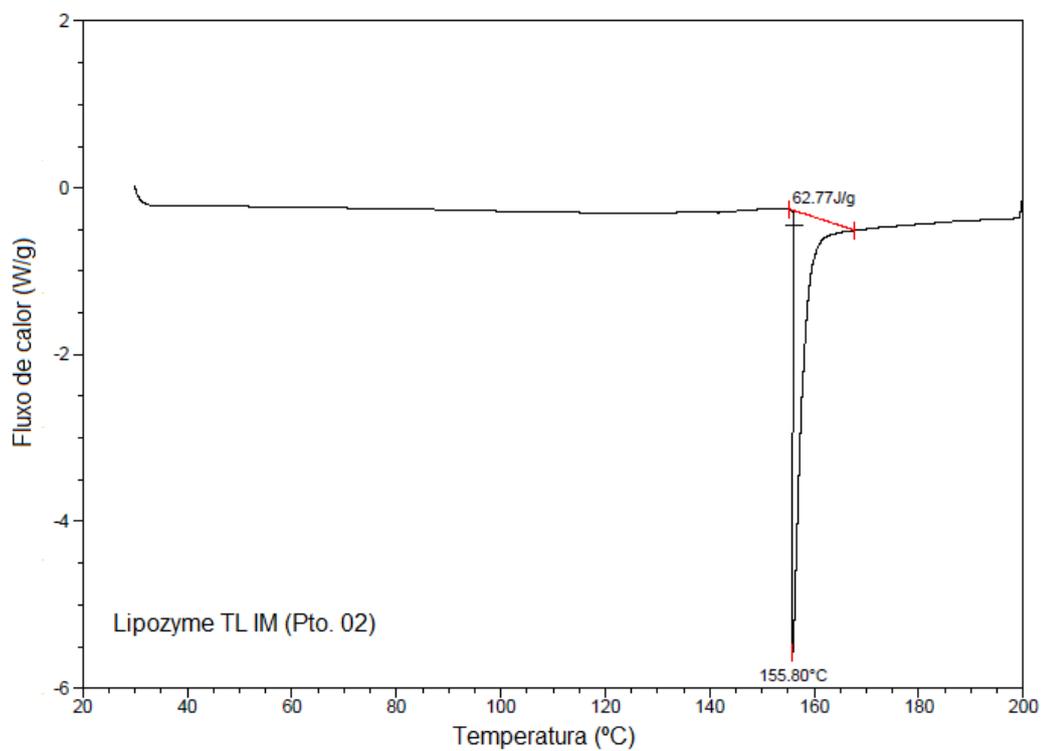
(f)

Figura A3 - Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) obtidas para determinação das temperaturas de fusão e entalpia de desnaturação das amostras referente ao suporte Amberlite IRA400 Cl⁻. (a) TLL livre, (b) Amberlite IRA400 Cl⁻, (c) TLL + Amberlite IRA400 Cl⁻, (d) TLL + Amberlite IRA400 Cl⁻ experimento 8, (e) TLL + Amberlite IRA400 Cl⁻ experimento 12, (f) TLL + Amberlite IRA400 Cl⁻ experimento 15.

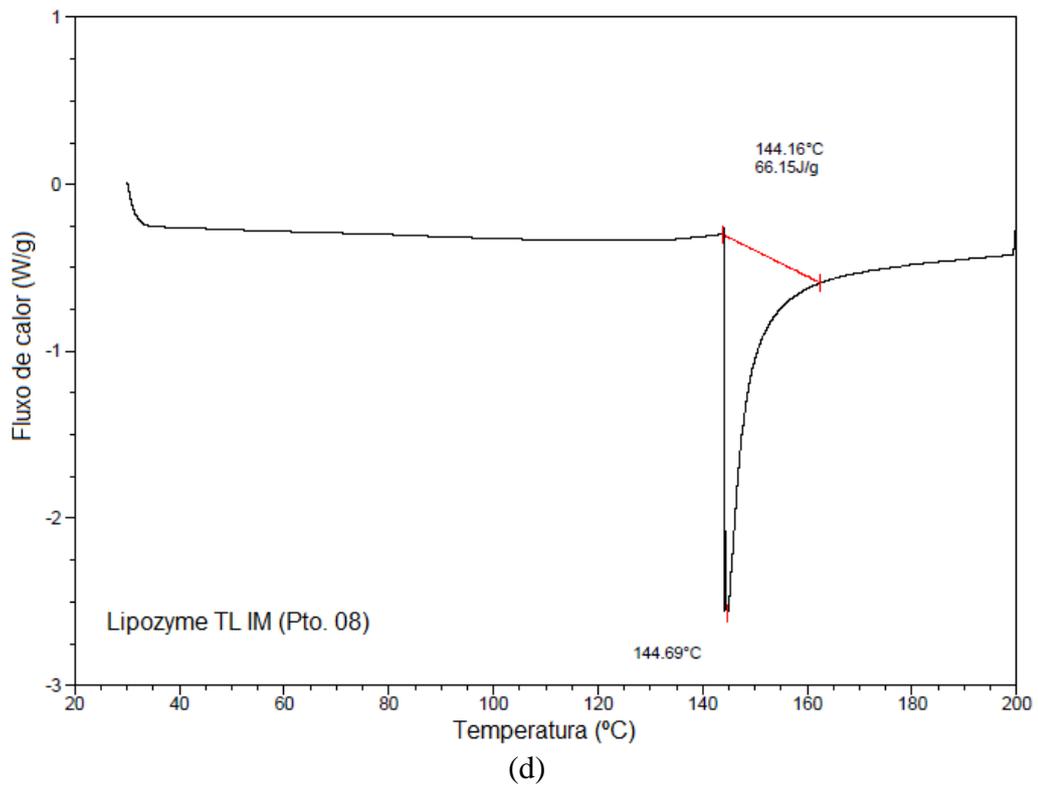
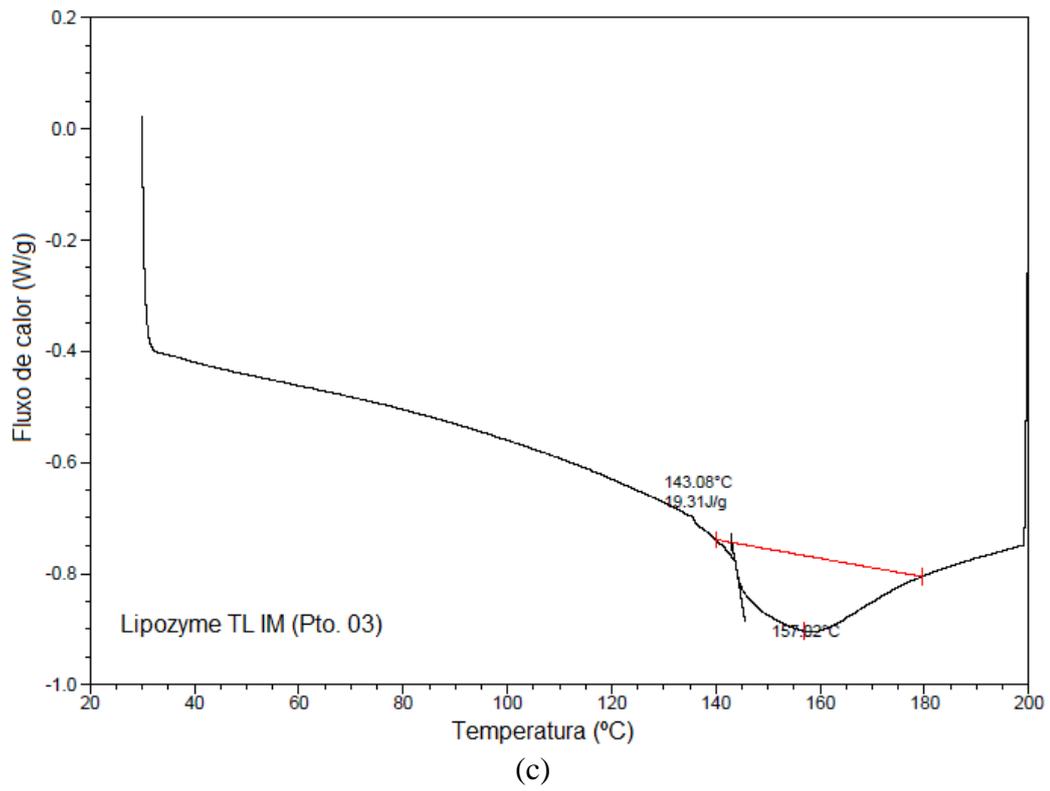
APÊNDICE C – CURVAS DE DSC REFERENTE A LIPOZYME TL IM

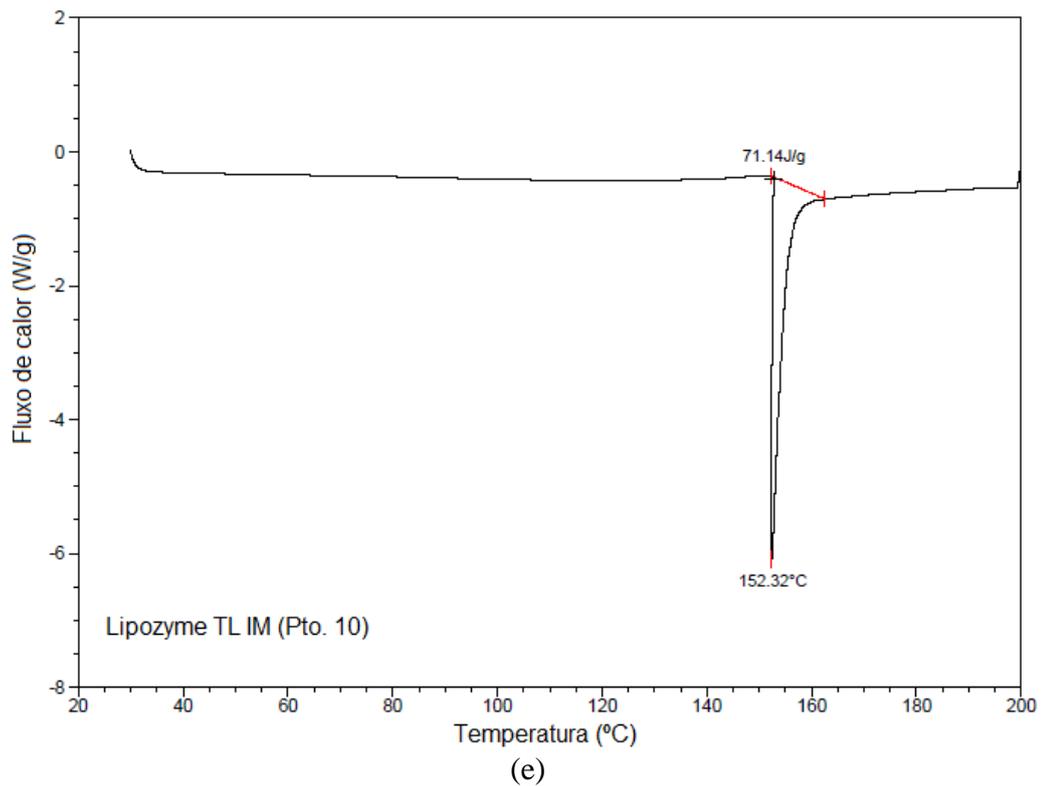


(a)



(b)





(e)
Figura A4 - Curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) obtidas para determinação das temperaturas de fusão e entalpia de desnaturação das amostras referente a Lipozyme TL IM. (a) Lipozyme TL IM antes do pré-tratamento, (b) Lipozyme TL IM experimento 2, (c) Lipozyme TL IM experimento 3, (d) Lipozyme TL IM experimento 8, (e) Lipozyme TL IM experimento 10.