

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP

Preparação e Caracterização da Lipase de *Burkholderia cepacia*, Imobilizada em Óxidos Metálicos Modificados com Líquidos Iônicos Próticos

Ingrid Cavalcanti Feitosa

ARACAJU, SE - BRASIL
ABRIL DE 2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP

Preparação e Caracterização da Lipase de *Burkholderia cepacia*, Imobilizada em Óxidos Metálicos Modificados com Líquidos Iônicos Próticos

Autor: Ingrid Cavalcanti Feitosa

Orientadores: Prof^o.D.Sc. Renan Tavares Figueiredo

Prof^a D.Sc. Cleide Mara Faria Soares

ARACAJU, SE - BRASIL
ABRIL DE 2016

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *BURKHOLDERIA CEPACIA*,
IMOBILIZADA EM ÓXIDOS METÁLICOS MODIFICADOS COM LÍQUIDOS IÔNICOS
PRÓTICOS

Ingrid Cavalcanti Feitosa

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS

Aprovado por:

Prof^o Dr. Ernandes Benedito Pereira (UNIFAL)

Prof^a Dra. Denise Santos Ruzene (UFS)

Prof^o Dra. Rebeca Yndira Cabrera-Padilla (UNIT)

Prof^o Dr. Ranyere Lucena Souza (UNIT)

Prof^o Dr. Renan Tavares Figueiredo (UNIT)

Prof^a Dra. Cleide Mara Faria Soares (UNIT)

ARACAJU, SE - BRASIL

ABRIL DE 2016

AGRADECIMENTOS

Pela FÉ, perseverança, força, coragem, otimismo e principalmente amor, agradeço a DEUS.

Ao meu esposo, Vitor, pela extrema PACIÊNCIA, amor, carinho, respeito, amizade e, sobretudo compreensão dedicados durante estes 4 anos “intermináveis”. Obrigado pela sua alegria e serenidade, por ser o cais onde posso aportar. *You make it easier when life gets hard*. TE AMO MUITO!!!

À minha família, meus pais Iêda e Jonaldo, ao meu irmão Irving e à minha avó Elizabeth, por serem meu “porto seguro” nas tempestades e os raios de Sol que sempre iluminaram a minha vida com amor, paz, alegrias, serenidade e esperança. As minhas tias, tios, primas e primos e especialmente a minha afilhada, que nasceu bem no início dessa longa jornada. Obrigado pela compreensão, devido à ausência e pelas palavras de apoio.

Aos meus sogros Jorge e Denise, que sempre tiveram palavras de amor, carinho e esperança. Especialmente a minha sogra-mãe Denise, que sempre disponibilizou seu colo e seus conhecimentos para a conservação da minha sanidade mental, ajudando de todas as maneiras conhecidas e desconhecidas.

Às minhas cunhadas Cristiane, Layla e Yanne e os cunhados Alysson e Diego por estarem sempre com uma palavra de apoio e carinho.

Aos amigos/irmãos que a vida me concedeu que sempre me apoiaram com suas palavras de carinho e compreensão.

Às minhas queridíssimas alunas de iniciação científica Luma Brandão e Renata Strappa pela enorme amizade, parceria, comprometimento, dedicação e ombro amigo que vocês ofereceram dentro e fora do laboratório. Só tenho a agradecer a Deus por esses anjos que me ajudaram no cumprimento do dever e nas horas de descontração (proporcionando boas risadas e fofocas). Quero ter filhos iguais a vocês.

Aos amigos do laboratório Marluce, Ana, Leandro, Marcela, Elayne, Vanina, Iraí, Adriana, Juliana, Lays, Poliane, Nayara, Jaci e Anderson pelas confissões, pelo ombro amigo, pelas palavras de apoio e carinho, por sempre ajudarem, por todos os cafés e doces que colaboraram para a nossa sobrevivência. Por estarem passando pela mesma etapa compreendiam perfeitamente todas as angústias, lágrimas e glórias alcançadas.

À prof^a Cleide pelo conhecimento transmitido, pela dedicação e principalmente pela nossa relação prof^a/aluna/amiga, na qual envolvia risos e lágrimas, pelas vitórias e derrotas. Obrigada professora, por escutar os desabafos e sofrimentos. Por oferecer sempre um ombro amigo nas horas de desespero. Muito obrigada pela compreensão desses momentos e pela perseverança.

Ao prof^o Renan que com seu jeito Zen e alegre de encarar a vida, colaborou com a manutenção da minha sanidade mental. Muito obrigado professor, pelo abraço amigo nas horas de angústia, pelas aulas de flauta nos momentos de serenidade, pelos cafés e risadas proporcionadas. Além da sua contribuição científica para o desenvolvimento do projeto durante esses quatro anos.

Ao prof^o Álvaro pela atenção e pela paciência de responder às minhas dúvidas e por compartilhar conhecimentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Catálise, Energia e Meio Ambiente (LCEM), do Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) e do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos 2 (LEB 2).

A todos os funcionários e professores do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e da Universidade Tiradentes (UNIT) que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização desta Tese.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro recebido para o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Processos.

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *BURKHOLDERIA CEPACIA*, IMOBILIZADA EM ÓXIDOS METÁLICOS MODIFICADOS COM LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS

A escolha de um suporte adequado é considerada tão importante quanto o método de imobilização, uma vez que, após a imobilização, será o principal responsável pelo microambiente da enzima imobilizada. A utilização de suportes metálicos, apresenta vantagens como estabilidade térmica e operacional. A modificação dos suportes com aditivos, têm sido uma técnica muito empregada nos dias atuais, para melhorar a estabilidade térmica e operacional dos biocatalisadores, bem como a área superficial e o tamanho dos poros do suporte. Os líquidos iônicos são um dos aditivos empregados, que possuem características como propriedades físico-químicas ajustáveis adequadas às inúmeras áreas de aplicação. O estudo da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) em suportes metálicos é relevante porque pode fornecer uma correlação entre a morfologia e as propriedades da enzima, que irão contribuir em sua compreensão do sistema imobilizado. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar físico-quimicamente os biocatalisadores imobilizados em ZnO e Al₂O₃ por ligação covalente, na presença de líquidos iônicos próticos (LIPs), e no caso do MgO na ausência de líquidos iônicos próticos, devido a sua finalidade cosmética, para o tratamento de peles acnéicas. Os resultados demonstraram que os melhores rendimentos de imobilização foram obtidos com uma carga de 0,1 g_{enzima}/g_{suporte} para a LBC imobilizada em Al₂O₃ modificada com o LIP de caráter mais hidrofílico, Acetato de metil monoetanolamina (2mHEAA) com 204,43%, seguido da LBC ZnO modificada com o Acetato de dietanolamina (BHEAA) que foi de 166%. Assim como a atividade lipolítica que foi de 740,98 U/g para LBC Al₂O₃ (2mHEAA) e 914,53 U/g para LBC ZnO (BHEAA). As caracterizações físicas foram realizadas através de análises de TGA/DTA, DRX, FTIR, MEV, BET.

Palavras-Chave: imobilização; óxidos metálicos; líquido iônico prótico; ZnO, Al₂O₃ e MgO.

Abstract of the thesis presented to the Post-Graduation Program in Process Engineering of Tiradentes University as part of the requirements for the Doctorate degree in Engineering Processes

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF *Burkholderia cepacia* LIPASE, IMMOBILIZED IN METAL OXIDES MODIFIED WITH PROTIC IONIC LIQUIDS

The choice of a suitable support is deemed as important as the immobilization method, since after the immobilization is primarily responsible for the microenvironment of the immobilized enzyme. The use of metal oxide like support, has the advantages of thermal and operational stability. Modifying these supports with additives, have been a great technique employed nowadays, to improve the thermal and operational stability of the biocatalysts and the surface area and pores size of the support. Ionic liquids are one of the additives used, having characteristics such as adjustable physicochemical properties suitable for many application areas. The study of immobilized *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) on metal is important because it can provide a correlation between the morphology of the support and the properties of the enzyme, which will contribute to its understanding of immobilized system. Therefore, the aim of this study was to characterize chemically-physical immobilized biocatalysts in ZnO and Al₂O₃ by covalent bond, in the presence of protic ionic liquids, and in the case of MgO in the absence of protic ionic liquids due to its cosmetic purpose, for treatment of acneic skins. The results showed that the best yield of immobilization was obtained for the load of 0.1 g_{enzyme} / g_{support} for BCL Al₂O₃ modified with LIP that have more hydrophilic character, Methyl Monoethanolamine Acetate (2mHEAA) was 204.43% and after by BCL ZnO modified with Diethanolamine Acetate (BHEAA) was 166%. As the lipolytic activity was 740.98 U/g to LBC Al₂O₃ (2mHEAA) and 914.53 U/g for ZnO BCL (BHEAA). The physical characterizations were performed using analysis of TGA/DTA, XRD, FTIR, SEM, BET.

Keywords: immobilization, metal oxide, protic ionic liquid, ZnO, Al₂O₃ and MgO.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO II.....	16
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	16
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	16
CAPÍTULO III	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 <i>Biocatálise</i>	17
3.1.1 <i>Enzimas</i>	19
3.1.2 <i>Lipase e Mecanismo de Ação</i>	21
3.2 <i>Biocatalisadores Imobilizados</i>	24
3.3 <i>Aditivos para Biocatalisadores Imobilizados</i>	30
3.4 <i>Suportes para imobilização</i>	33
3.4.1 <i>Óxidos Metálicos</i>	38
CAPÍTULO IV.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
<i>ARTIGO 1</i>	45
<i>Immobilization of lipase on organometallic support in the presence of additives</i>	45
1. <i>Introduction</i>	47
2. <i>Experimental</i>	49
2.1 <i>Materials</i>	49
2.2 <i>Organometallic support ZnO</i>	49
2.3 <i>Immobilization of the biocatalyst by Covalent Binding</i>	51
2.4 <i>Lipolytic activity</i>	51
2.5 <i>Physical-Chemical and Morphological Characterization</i>	51
2.6 <i>Selection and Biochemical properties of the BCL onto organometallics</i>	52
3. <i>Results and Discussion</i>	53
3.1. <i>Effect of loading enzyme/support</i>	53
3.2. <i>Selection of the Immobilized Biocatalyst</i>	54
3.3. <i>Thermal and operational stability</i>	56
3.4. <i>DTA/TGA Characterization</i>	58
3.5 <i>X-Ray diffraction of the precursor ZnO</i>	60
3.6 <i>X - Ray diffraction of immobilized biocatalysts in the presence and absence of protic ionic liquid</i>	62
3.7 <i>Nitrogen adsorption-desorption</i>	64
3.8. <i>FT-IR Measurements</i>	67
<i>In order to support the FTIR results and to confirm the occurrence of functionalization and immobilization, the modifications produced by these reactions were further investigated by BET analysis.</i>	69
3.9 <i>Scanning electron microscope (SEM)</i>	70
4. <i>Conclusion</i>	71
5. <i>Acknowledgments</i>	72

6. References.....	73
ARTIGO 2.....	78
<i>Improved enzymatic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized in Al₂O₃ modified with protic ionic liquids</i>	78
1. Introduction	80
2. Experimental.....	81
2.2 Preparation of the support.....	81
2.3 Immobilization of Burkholderia cepacia lipase (BCL) in Al ₂ O ₃ support.....	82
2.4 Characterization of fixed brackets.....	83
2.5 Activity Assay of immobilized biocatalysts	83
3. Results and Discussion	84
3.1. Catalytic Activity	84
3.3. Effect of temperature and recyclability of immobilized biocatalyst.....	86
3.4. DTA/TGA Characterization.....	89
3.5. X-Ray diffraction of the precursor Al ₂ O ₃	90
3.7 Scanning electron microscope (SEM).....	92
3.8 Fourier Transformation Infrared Spectrum (FTIR).....	93
3.9. Nitrogen Adsorption-Desorption	95
4. Conclusion.....	99
PATENTE	104
<i>Imobilização de lipase de Burkholderia cepacia em óxido de magnésio com finalidade cosmética.</i>	104
<i>Imobilização do biocatalisador por Ligação Covalente</i>	112
CAPÍTULO V	126
CONCLUSÕES.....	126
CAPÍTULO VI.....	128
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	128
CAPÍTULO VII	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interdisciplinaridade da biotecnologia e da biocatálise e usos industriais (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004).	19
Figura 2. Reação geral de esterificação, transesterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise (GUPTA <i>et al.</i> , 2013).	21
Figura 3. Modelo tridimensional da lipase de Burkholderia cepacia (SCHRAG <i>et al.</i> , 1997).	22
Figura 4. Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de enzimas (SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012).	26
Figura 5. Imobilização com glutaraldeído mediante um suporte que contém o grupamento amina (ADLERCREUTZ, 2013).	28
Figura 6. Cátions e Ânions mais comuns utilizados na produção dos LIs (FAUZIN & AMIM, 2012).	31
Figura 7. Representação gráfica de dois tipos de funcionalização de nanopartículas a) nanopartículas de ouro funcionalizadas; (b) nanotubos de carbono funcionalizados (CUNHA <i>et al.</i> , 2010).	Erro! Indicador não definido.
Figura 8. Micrografia do ZnO (SILVA <i>et al.</i> , 2010).	40
Figura 9. Esquema mostrando as áreas que têm maiores aplicações dos materiais nanoestruturados de alumina (JANI <i>et al.</i> , 2013).	42
Figura 10. Micrografia (MEV) da membrana de Al ₂ O ₃ nanoporosa, com tamanho de poro de 72 nm (POPAT <i>et al.</i> , 2004).	42

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos biocatalisadores.....	18
Tabela 2. Classificação das enzimas de acordo com a International Union of Biochemistry.....	20
Tabela 3. Suportes frequentemente utilizados em imobilização.....	34
Tabela 4. Classificação dos poros segundo a IUPAC.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

Al ₂ O ₃	Óxido de Alumínio
[BMIM][TfO]	1-butil-3-metilimidazolio trifluorometanosulfonato
BHEAA	Acetato de Dietanolamina
BIs	Biocatalisadores imobilizados
[EMIM][BF ₄]	1-etil-3-metilimidazolio
EDC	Carbodiimida
GLU	Glutaraldeído
IEP	Ponto Isoelétrico
LIs, LI	Líquidos Iônicos
LIP, PIL	Líquido Iônico Prótico
LIPs, PILs	Líquidos Iônicos Próticos
LIA	Líquidos Iônicos Apróticos
2mHEAA	Acetato de Metil monoetanolamina
LBC, BCL	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
2HEAA	Acetato de Monoetanolamina
MgO	Óxido de Magnésio
γ-APTS	(3-Aminopropil) trietoxisilano
ZnO	Óxido de Zinco

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

Os suportes hidrofóbicos são considerados uma boa alternativa para a imobilização de lipase, por fornecerem uma superfície adequada para o fenômeno de ativação interfacial devido ao caráter anfifílico da “tampa” na conformação aberta da enzima (KHOABI *et al.*, 2015). A imobilização da lipase em superfícies sólidas, como óxidos metálicos, é uma área promissora devido à importância das lipases como biocatalisadores e sua aplicação industrial. A aplicação dos óxidos metálicos, tais como Al_2O_3 , TiO_2 , ZnO , Fe_3O_4 , e MgO são de particular interesse porque não só são estáveis sob condições adversas (temperatura e agitação), mas também são geralmente considerados como materiais seguros para os seres humanos, animais e plantas, que de acordo com os princípios da química verde para gerar menos resíduos tóxicos e de efluentes (AL-HAZMI *et al.*, 2012).

A importância e o interesse do uso desses óxidos metálicos, têm mostrado potencial como catalisador nos estudos relatados na literatura. Em geral, esses óxidos são utilizados como UV-laser, fotodetectores-UV, sensores de gases, sensores químicos, biosensores, células solares, bioimagem, produtos médicos, protetores solares, nanotubos, loções para a pele, e na biocatálise com a imobilização de enzimas (TSAY *et al.*, 2013; MALEK *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010).

Até o presente momento não foi verificado o uso de líquidos iônicos próticos como aditivos no processo de modificação dos suportes de óxidos metálicos para a imobilização de lipase, contudo já foi utilizado líquidos iônicos apróticos como agentes modificadores de suportes como: SiO_2 , TiO_2 , $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, e MgO para testar os limites da sua estabilidade térmica (AKÇAY *et al.*, 2015).

Os líquidos iônicos (LIs) vêm sendo muito utilizados nas últimas duas décadas devido às suas propriedades físico-químicas ajustáveis adequadas às inúmeras áreas de aplicação, tais como, eletroquímica, catálise e biocatálise (ENDRES *et al.*, 2004; VIRTANEN *et al.*, 2007). Uma alternativa aos solventes orgânicos voláteis é o uso de alguns LIs, devido a baixa

volatilidade e a propriedade de manterem a atividade enzimática de diferentes sistemas imobilizados. Ao serem utilizados com solventes orgânicos, podem ter sua viscosidade diminuída, que é o que tem limitado seu uso, sem alterar os níveis de cátions e ânions no sistema (SPERANZA, 2012).

Os LIs podem ser classificados em dois tipos: Líquidos Iônicos Apróticos (LIA) e os Líquidos Iônicos Próticos (LIP). Os líquidos iônicos apróticos são constituídos principalmente de cátions orgânicos a base de imidazólio, piridino, tetraalquilamônio e tetraalquilfosfônio, apresentando elevado custo de síntese (ZARCULA *et al.*, 2009). Ao passo que os Líquidos Iônicos Próticos (LIP) são formados pela combinação estequiométrica de um ácido e uma base de Bronsted, desta forma, quando um líquido iônico prótico é sintetizado, o próton fica localizado fortemente sobre a base. Os LIP apresentam algumas vantagens em relação ao LIA, que é de fácil preparação e de baixo custo (ANOUTI *et al.*, 2010).

Apesar dos poucos relatos descritos na literatura em que os suportes são modificados por líquidos iônicos próticos (LIPs) ou que são utilizados em reações de imobilização ainda é necessário explorar esses tipos de materiais e alcançar melhores efeitos (GAO *et al.*, 2015). A utilização de LIPs em suportes hidrofóbicos, como a sílica, para a modificação da sua superfície, pode fornecer um aumento do rendimento de imobilização em comparação ao suporte sem a modificação com o líquido iônico prótico, demonstrando um efeito benéfico na estrutura morfológica (aumentando seu caráter hidrofóbico) e na interação catalítica do biocatalisador imobilizado (SOUZA *et al.*, 2013).

Neste contexto, faz-se necessário estudos avaliando a utilização dos óxidos metálicos Al_2O_3 e ZnO, modificados com líquidos iônicos próticos (LIP) para a imobilização de enzimas lipolíticas para aplicações industriais, tais como produção de cosméticos, produção de biodiesel e outras reações (US20030026794). Deve-se ressaltar que ainda não foi verificado o uso do MgO como suporte para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* com intuito de remover a oleosidade em peles acnéicas, efetuando uma esfoliação com as biopartículas.

Portanto, neste estudo realizou-se a preparação dos óxidos metálicos Al_2O_3 e ZnO , com a presença de líquidos iônicos próticos, utilizando o método de precipitação. Após a obtenção dos óxidos obtidos foram realizados os procedimentos de imobilização com a lipase de *Burkholderia cepacia*, utilizando diferentes líquidos iônicos próticos (*Acetato de metil-monoetanolamina - 2mHEAA*; *Acetato de monoetanolamina - 2HEAA* e *Acetato de dietanolamina - BHEAA*). Os biocatalisadores obtidos foram caracterizados por meio das técnicas Termogravimétrica (TG/DTA - DSC), Isotermas de adsorção-desorção de N_2 (BET)/Distribuição de volume de poros (BJH), Difração de raios X (DRX), Infravermelho em Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Afim de obter um novo produto, obteve-se a lipase imobilizada por ligação covalente em MgO com finalidade cosmética no intuito de remover os lipídios excessivos da pele e efetuar uma limpeza gradativa destas biomoléculas.

Capítulo II

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial da lipase imobilizada em óxidos metálicos modificados com líquidos iônicos próticos (LIPs) a partir da caracterização bioquímica, físico-química, morfológica e avaliar o potencial da lipase imobilizada em óxido metálico para aplicação cosmética.

2.2 Objetivos Específicos

Para a obtenção do objetivo geral, foram estabelecidos alguns objetivos específicos, como:

- Avaliar a eficácia dos agentes precipitantes na preparação dos óxidos metálicos;
- Imobilizar por ligação covalente a lipase de *Burkholderia cepacia* nos óxidos metálicos, ZnO e Al₂O₃, modificados com líquidos iônicos próticos;
- Avaliar o potencial de aplicação do biocatalizador imobilizado em MgO com finalidade cosmética e caracterizá-los por meio de análises de TGA/DTA e FTIR;
- Caracterizar bioquimicamente quanto ao rendimento de imobilização; a estabilidade térmica e a estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados;
- Caracterizar físico-química e morfológicamente os biocatalisadores imobilizados à partir das técnicas de: Termogravimetria (DTA/TG); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR); Isotermas de adsorção-desorção de N₂ (BET)/ Distribuição de volume de poros (BJH) e Difração de raios X (DRX).

Capítulo III

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo será visto um breve enfoque dos principais temas relacionados com o trabalho desenvolvido. Iniciando-se pela conceituação da biocatálise, enzimas, lipases, métodos de imobilização, óxidos metálicos, uso de aditivos e aplicação da caracterização bioquímica, morfológica e físico-química para biocatalisadores imobilizados.

3.1 Biocatálise

A biocatálise promove processos geralmente seguros e sustentáveis, contribuindo assim para o cumprimento dos princípios da química verde em geral. A biocatálise tornou-se uma tecnologia de grande valor no mercado, especialmente quando se trata da síntese de compostos. Devido aos importantes avanços tecnológicos no campo, as enzimas estão disponíveis como catalisadores eficientes e seletivos para praticamente qualquer reação química, seja em água ou solventes orgânicos, evitando assim o impacto ambiental e a toxicidade causada pela maior parte dos catalisadores químicos (ANTHONSEN e FESSNER, 2009; BOLIVAR *et al.*, 2013).

O potencial biocatalítico das lipases são amplamente utilizados em diversos setores industriais como na produção de biodiesel, fármacos, alimentos e bebidas, na indústria agroquímica, têxtil, de papel, como biosensores na área biomédica e ambiental e na formulação de detergentes e cosméticos (WANG *et al.*, 2015).

As lipases podem ser utilizadas na hidrólise de diferentes óleos como o de palma, óleo de oliva, girassol, babassu, etc. (GUPTA *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2011). No processo de produção do biodiesel, utilizando enzimas lipolíticas imobilizadas, por serem consideradas “verdes” devido ao seu reciclo e diferentes fontes de gorduras, tanto animal quanto vegetal. DA ROS *et al.* (2010), produziu biodiesel com acetanólise enzimática do sebo de boi utilizando radiação micro-ondas e a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA. Outros estudos apresentaram alternativas diferentes, como por exemplo, SHAMEL *et al.* (2007) que para

conseguir uma melhor produção de biodiesel, removeu o subproduto (glicerol) no processo contínuo.

Enquanto as enzimas apresentam grande vantagem em termos de seletividade, sua maior restrição é a baixa estabilidade, quando na forma livre. Ainda, o fato do longo tempo de desenvolvimento de um novo biocatalisador e o insuficiente conhecimento da biocatálise limita a ampla aplicação em processos biotecnológicos. Os biocatalisadores apresentam inúmeras vantagens e desvantagens conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos biocatalisadores.

Vantagens	Desvantagens
Alta enantioseletividade	Baixa atividade específica
Alta regioseletividade	Baixa estabilidade em condições desnaturantes (temperatura e pH extremos e forte agitação)
Alta quimioseletividade	Disponibilidade limitada
Condições suaves de reação	Longo tempo de desenvolvimento para novas enzimas
Compatíveis entre si	Passíveis de sofrer inibição pelo substrato ou produto
Ambientalmente Correta (apresenta biodegradabilidade comparada aos metais pesados)	

Fonte: FABER (1997); MILETIC *et al.* (2009); ZHOU *et al.* (2010).

Diferentes aplicações são citadas na literatura, tais como o seu uso em biosensores para aplicação em diagnósticos clínicos, na determinação quantitativa de triacilgliceróis para o controle do nível de lipídios no sangue de pacientes com queixas cardiovasculares; na indústria alimentícia, com o objetivo de enriquecer o sabor a itens alimentares, pois os ácidos graxos livres e ésteres atuam como precursores de aroma e sabor; no diagnóstico e controle ambiental, principalmente contaminação por pesticidas, tratamento de efluentes para a degradação de óleos poliésteres de águas residuais, purificação de gases residuais provenientes de fábricas, etc (SHARMA *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2013).

As áreas de aplicação da biocatálise abrangem diferentes indústrias, sendo as mais importantes: farmacêutica, alimentos, química fina (especialidades químicas), química básica, polpa e papel, agricultura, medicina, cosmética, produção de energia e mineração (Figura 1).

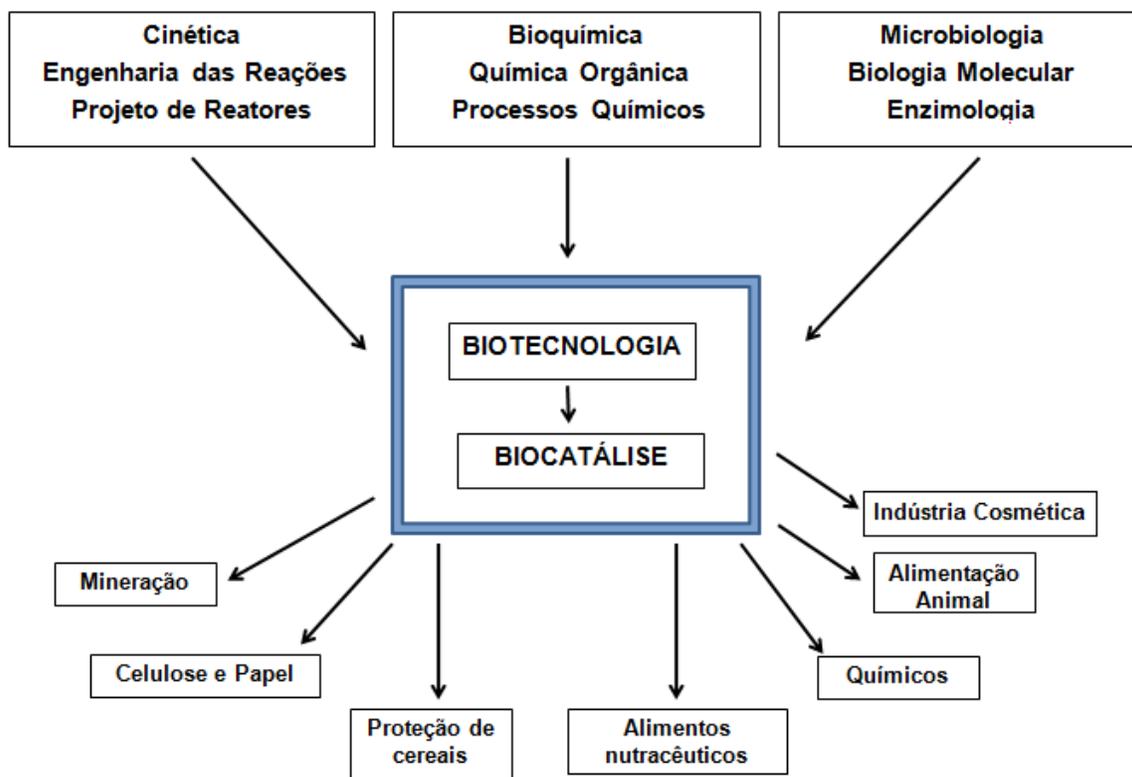


Figura 1. Interdisciplinaridade da biotecnologia e da biocatálise e usos industriais (BOMMARIUS e RIEBEL, 2004).

As pesquisas nessa área se justificam para buscar uma melhor compreensão do processo biocatalítico, assim como para a melhoria da estabilidade da enzima como por exemplo utilizando diferentes métodos de imobilização com vistas a aplicação cosmética ou outros produtos e/ou processos.

3.1.1 Enzimas

As enzimas são biocatalisadores protéicos que possuem uma série de características que as tornam mais vantajosas em um processo industrial quando comparadas à catálise química convencional, como: alta especificidade do substrato, seletividade, regioespecificidade e estereoespecífica (MACARIO *et al.*, 2009). As enzimas possuem estrutura protéica globular terciária ou quaternária, são termolábeis aumentam a velocidade de uma reação química, isto é, atuam reduzindo a barreira energética das reações (MILETIC *et al.*, 2009).

As enzimas apresentam alta especificidade na reação, o que permite distinguir não somente as reações como também os substratos (especificidade pelo substrato), partes similares de uma molécula (régio-especificidade) e entre isômeros ópticos (estéreo-especificidade) (YE *et al.*, 2007). A velocidade da reação enzimática é influenciada pelas concentrações de substrato e enzima, pH, temperatura e presença de ativadores ou inibidores enzimáticos (COSTA NETO, 2000; CASTRO *et al.*, 2004; SILVA, 2010).

A classificação dos biocatalisadores fundamenta-se nas suas propriedades catalíticas. Deste modo, o nome de uma enzima não especifica a estrutura, mas, contrariamente, define a principal reação catalisada. As enzimas são divididas em seis categorias principais, conforme descrito na Tabela 2, considerando suas propriedades para catalisar reações químicas.

Tabela 2. Classificação das enzimas de acordo com a International Union of Biochemistry.

Grupos de Enzimas	Tipos de Reação
1.Oxidoredutases	Catalisa reações de óxido-redução, como: dehidrogenase; oxidase; peroxidase; glucose oxidase, etc.
2.Transferases	Catalisa a transferência de grupos funcionais acilas, aldeído ou cetona, aminoácidos, açúcares de uma molécula para outra.
3.Hidrolases	Catalisa reações hidrolíticas de lipase, fosfatase alcalinas e colesterol de esterase.
4.Lipases	Catálise de adição, usualmente HX, para ligações duplas, tais como C=C, C=N e C=O, e reações reversas.
5.Isomerasas	Isomerização catalítica. Pode ser feita em racemases, epimerases, mutases, etc.
6.Ligases	Condensação de dois substratos com a divisão de ATP.

Fonte: GUPTA *et al.*, (2013).

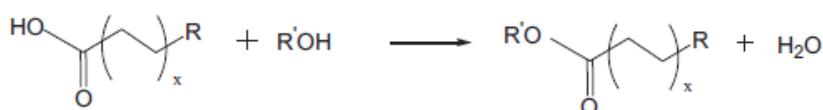
De acordo com GUPTA *et al.* (2013), a conformação da enzima depende do ambiente da enzima, uma vez que é feita pelas interações entre o constituinte de resíduos aminoácidos. As enzimas possuem uma estrutura tridimensional de proteína dobrada. Essa estrutura é responsável pela natureza e especificidade do comportamento catalítico, que é analisada pela sequência dos aminoácidos.

3.1.2 Lipase e Mecanismo de Ação

As lipases (glicerol-ester-hidrolases, E.C.3.1.1.3) são um importante grupo biotecnologicamente relevantes de enzimas que podem ser aplicadas em diversos ramos da indústria e são encontradas em microrganismos, animais e plantas (HASAN *et al.*, 2009). Dentre as lipases, as microbianas são amplamente utilizadas devido à sua facilidade de extração e seus altos rendimentos (GUPTA *et al.*, 2013).

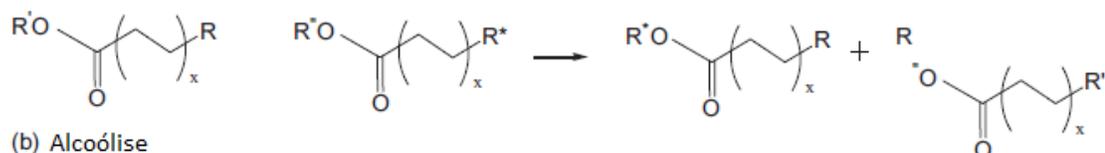
As lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise em meio aquoso, mas também podem catalisar reações em meios não convencionais, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólises e acidólises) (Figura 2), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade em meio reacional aquoso é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (MENDES *et al.*, 2005; PAQUES e MACEDO, 2006).

(A) Esterificação



(B) Transesterificação

(a) Interesterificação



(b) Alcoólise



(c) Acidólise



Figura 2. Reação geral de esterificação, transesterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise (GUPTA *et al.*, 2013).

De acordo com SHARMA *et al.* (2011), dois critérios são comumente usados para identificar uma enzima lipolítica (E.C.3.1.1.3): o primeiro é que a enzima tem que ser ativada pela presença de uma interface, isto é, a sua atividade deve aumentar assim que os triglicérides formarem uma emulsão. Este fenômeno é denominado como "ativação interfacial"; e o segundo é que na superfície da enzima deve conter uma espiral protéica cobrindo o seu sítio ativo, que é chamada de "tampa", afastando-a do contato com a interface.

A Figura 3 descreve a estrutura cristalina da lipase de *Burkholderia cepacia* destacando-se por apresentar algumas características incomuns a outras lipases como um sítio de cálcio que, supostamente, estabiliza a tríade catalítica e a presença de um carboxilato adicional que pode servir como uma alternativa para aceitação de prótons (SCHRAG *et al.*, 1997).

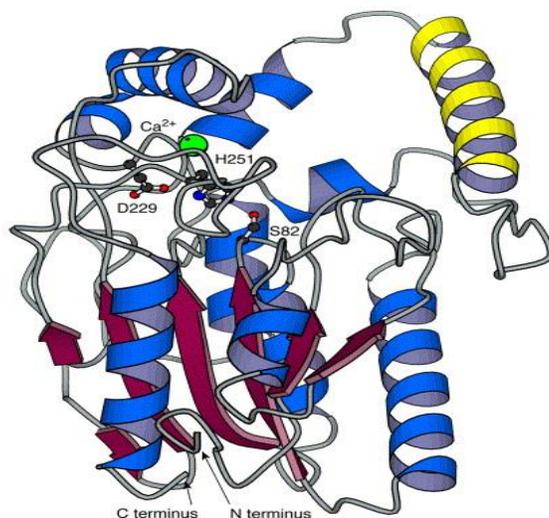


Figura 3. Modelo tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia* (SCHRAG *et al.*, 1997).

A tríade catalítica da lipase para hidrólise de ésteres é similar à tríade catalítica da protease e envolve a formação de dois tetraedros intermediários. O seu sítio ativo é composto pelos grupamentos imidazólico da histidina, hidroxila da serina e carboxila do ácido aspártico (His, Ser e Asp). Esses grupamentos trabalham em conjunto na ação de transferência de um grupo acil para serina. Estudos cristalográficos demonstraram que a estrutura da lipase apresenta um padrão conformacional comum, denominado de conformação α/β hidrolase, composto de

uma sequência de α –hélices e folhas β -pregueadas alternadas (JAEGER *et al.*, 1999; KAPOOR *et al.*, 2012).

A estrutura e o mecanismo de ação das lipases vêm sendo esclarecidos mediante o uso de técnicas clássicas de raios-X e técnicas avançadas de ressonância magnética nuclear (RMN) (PAULA *et al.*, 2008), entre outras. Na maioria destas enzimas o sítio ativo é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004). O sítio ativo das lipases é cercado por áreas hidrofóbicas.

Há uma diversidade de lipases que vem sendo produzidas por cultura submersa ou métodos de fermentação no estado sólido usando várias espécies de microrganismos, tais como as lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, *Mucor javanicus*, leveduras como *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Tulopsis sp*, e lipases bacterianas como as *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae* e *Pseudomonas fluorescens* (DALLA-VECCHIA, *et al.*, 2004; REETZ, *et al.*, 1998).

Uma das lipases mais populares, usadas em síntese orgânica nas reações de hidrólise e transesterificação é a lipase de *Burkholderia cepacia*, Figura 3, anteriormente denominada de *Pseudomonas cepacia*. Ela é considerada como uma bactéria ubíqua, classificada como bacilo gram-negativo que possuem temperatura ótima de crescimento entre 30- 35°C, não esporulada, móvel, da família *Pseudomona daceae*. Seus habitats primários incluem sedimentos dos rios, solo e plantas (BERRIATUA *et al.*, 2001).

Em 1950, William Burkholder descreveu a *Pseudomonas cepacia* como um patógeno de plantas. Após a sua caracterização tornou-se claro que esse grupo de bactérias era altamente versátil e capaz de uma variedade de interações complexas, tais como a degradação de contaminantes aromáticos complexos, e interação com humanos e animais (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2007).

A *Burkholderia cepacia* é utilizada para a produção de lipases gerando enzimas com grande estabilidade em solventes orgânicos e um alto grau de enantioseletividade, fazendo com que

sejam utilizadas na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros. Geralmente as lipases de *Burkholderia cepacia* são utilizadas após a imobilização a fim de se obter biocatalisadores imobilizados com maior estabilidade operacional (JAEGER *et al.*, 1999).

A especificidade é uma característica importante das lipases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidas: a primeira é a especificidade em relação à classe de lipídios. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo di-, tri-, ou monoglicerídeo, colesterol éster, metil éster, etc. A segunda é a região-especificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade com relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a enzima lipolítica é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereo-especificidade, ou seja, algumas destas enzimas catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereo isômeros (COSTA & AMORIM, 1999; SOARES *et al.*, 2000).

Para a ativação interfacial da enzima é necessária uma indução através da adsorção da lipase numa interface orgânico-aquosa, sendo esta ativação relacionada com as mudanças conformacionais da enzima. Na ausência da interface água-lipídeo, o sítio ativo estaria recoberto por uma tampa hidrofóbica, fazendo com que o sítio não tivesse acesso ao substrato, isto conforme o mecanismo de ativação interfacial. Alguns estudos de cristalografia de raios-X demonstraram que o sítio ativo das lipases são recobertos, com isso levaria a enzima a um rearranjo conformacional da sua tampa, permitindo assim o acesso do substrato ao sítio ativo (VERGER, 1997; KAPOOR e GUPTA, 2012). A lipase é uma das enzimas mais versáteis utilizadas na indústria e para sua aplicação em larga-escala é necessário a sua imobilização (JALADI *et al.*, 2009)

3.2 Biocatalisadores Imobilizados

As técnicas de imobilização de enzimas têm demonstrado nos últimos anos um crescente aumento, devido à demanda da utilização de enzimas em escala industrial. Visando a minimização do seu custo, estudos estão sendo realizados no intuito de se obter enzimas

cataliticamente ativas e insolúveis no meio reacional, que podem ser recuperáveis e cataliticamente estáveis.

As enzimas imobilizadas por definição são aquelas que se encontram confinadas em uma estrutura, contendo barreiras (suporte) que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio reacional, tornando-as pouco solúveis, independente do meio (GIRELLI e MATTEI, 2005). A sua composição se dá por meio de dois componentes essenciais: o suporte, que possui estrutura não catalítica, designado para o reuso do catalisador, separação e facilitação do controle do processo. É a enzima, que representa o componente catalítico funcional, indicado para converter os substratos de interesse em produtos desejados (CAO *et al.*, 2003).

Uma rota importante para a melhoria do desempenho das enzimas em ambientes não naturais é imobilizá-las. Na imobilização de enzimas não existe um método único cuja metodologia se aplique eficazmente para qualquer sistema enzimático, com isso não há como prever a magnitude da atividade e a estabilidade da enzima após o processo de imobilização. A abordagem para o processo de imobilização envolve tipicamente procedimentos de tentativa e erro, até que um sistema satisfatório tenha sido desenvolvido. Nesse estágio, deve-se levar em conta, especialmente, a estabilidade alcançada após o processo de imobilização. (HANEFELD *et al.*, 2009).

Os métodos de imobilização de enzimas podem abranger processos físicos, químicos e por bioafinidade, podendo ocorrer pela adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel; pelo uso de um reagente multifuncional utilizando ligações cruzadas; confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos e encapsulação por membrana. Esses métodos são denominados de adsorção física, ligação iônica, ligação covalente, aprisionamento, microencapsulação e afinidade (Figura 4) (DALLA-VECHIA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011; MILÉTIC *et al.*, 2012).

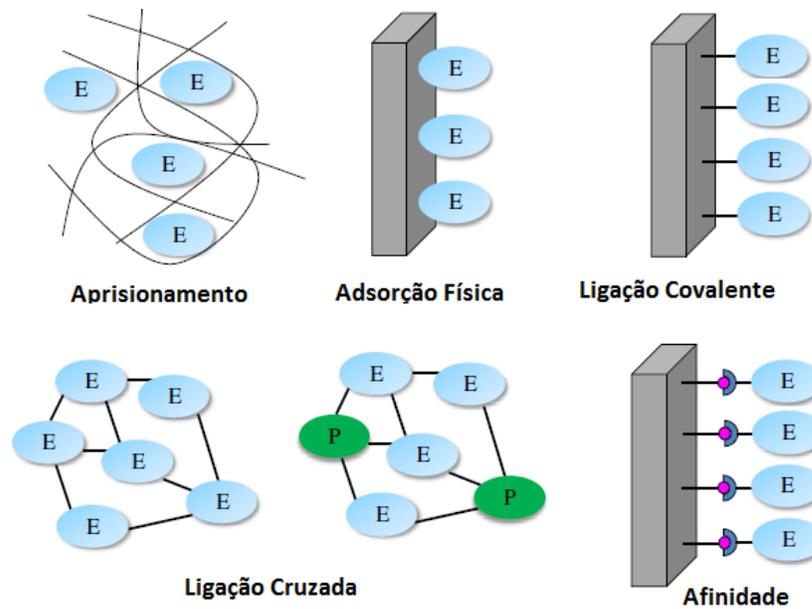


Figura 4. Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de enzimas (SASSOLAS *et al.*, 2012).

Segundo TRECANI *et al.* (2013), cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens. A escolha da técnica mais apropriada depende de vários fatores, incluindo as propriedades da superfície do material, a natureza das biomoléculas e a sua aplicação. O aspecto mais crítico na biofuncionalização do sistema é o que diz respeito à atividade e estabilidade das biomoléculas após a imobilização. Geralmente é reconhecido que, quando em contato ou imobilizado na superfície do material, as biomoléculas podem perder a sua atividade, devido a alguns aspectos, como: natureza da biomolécula; natureza da superfície e/ou a natureza da interface entre a enzima (DATTA *et al.*, 2013).

Os métodos de imobilização de biocatalisadores descritos na literatura para suportes metálicos são:

Adsorção Física

A imobilização por adsorção física pode ser considerada um método simples, econômico e menos dispendioso uma vez que é realizada mergulhando o material em uma solução que contenha as biomoléculas alvos. É baseada em interações eletrostáticas como forças de Van der

Walls; ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas. Essas interações eletrostáticas são determinadas pela proporção entre o ponto isoelétrico (IEP) de superfície, da constante de dissociação do ácido (pK_a) e do estado de valência dos grupos funcionais de adsorver espécies num ambiente líquido (TRECANI *et al.*, 2013; NOINVILLE *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2009, MENDES, *et al.* 2011).

A adsorção física é um método baseado nas propriedades inerentes da membrana do material, de modo que o suporte, bem como a enzima não necessite de nenhuma modificação específica conseqüentemente é menos prejudicial à inativação catalítica da enzima, uma vez que os biocatalisadores ao serem imobilizadas não sofrem alterações significativas em sua estrutura tridimensional que leve a sua desnaturação. Além disso, os suportes podem ser facilmente regenerados após a desnaturação natural das enzimas. Esta abordagem é considerada particularmente adequada para a funcionalização de substratos altamente porosos (GUPTA *et al.*, 2013).

A principal desvantagem deste método se deve a uma consequência inevitável de perda por dessorção, resultante das fracas interações que as enzimas estabelecem com os suportes. Para a adsorção iônica essa desvantagem é menos pronunciada devido à formação de ligações íon-íon mais efetivas com o suporte. Contudo, durante o processo de lavagem ou mesmo após as operações catalíticas pode ocorrer dessorção das enzimas e, por conseguinte, há uma diminuição da atividade catalítica (SILVA *et al.*, 2009).

A afinidade de adsorção da lipase na superfície de uma membrana, geralmente aumenta quanto maior for sua hidrofobicidade. Uma das suas principais vantagens é a melhoria da sua atividade após a adsorção no suporte hidrofóbico, onde a superfície do suporte assemelha-se à interface dos substratos naturais e cria uma mudança conformacional na lipase, forma aberta (NOINVILLE *et al.*, 2002). DIAZ E BALKUS (1996) utilizaram a adsorção física como método de imobilização da enzima papaína e tripsina em óxido de nióbio.

Ligação Covalente

A imobilização covalente de lipases baseia-se em promover um ataque químico da enzima através de seus grupos nucleofílicos na superfície de um suporte apropriadamente ativado. Segundo KNEŽEVIĆ, *et al.* (2004) a imobilização covalente de lipases na superfície de suportes sólidos é mais vantajosa do que outros métodos porque minimiza consideravelmente as restrições difusionais tanto do substrato quanto do produto. Além disso, a imobilização covalente oferece a vantagem de proporcionar maior estabilidade e prevenir possíveis perdas de atividade enzimática por dessorção das enzimas.

Segundo TRECCANI e colaboradores (2013), uma das estratégias mais comuns para imobilização covalente de biomoléculas é utilizar soluções de brometo de cianogênio (CNBr)-agarose, ativado com Sepharose contendo hidratos de carbono, glutaraldeído (GA) (Figura 5) ou carbodiimida (EDC), servindo como braço espaçador. Exercendo uma termoestabilidade na ligação covalente de enzimas. Esses métodos são aplicados rotineiramente para a imobilização de peptídeos, proteínase oligonucleotídeos, e outros tipos de objetos funcionais.

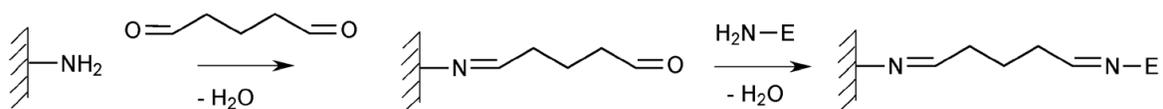


Figura 5. Imobilização com glutaraldeído mediante um suporte que contém o grupamento amina (ADLERCREUTZ, 2013).

De acordo com GUPTA *et al.*, (2013), a viabilidade química da ligação covalente, pode ser feita modificando a reação química da lipase. Sendo a reação da enzima realizada por um grupo reativo de componentes químicos que podem facilmente alterar a estrutura e a atividade catalítica da enzima. Embora seja melhor do que o método de adsorção em muitos aspectos, ele possui algumas limitações. No qual inclui eventuais perdas na atividade catalítica da lipase, uma vez que os métodos devem ser realizados em diferentes faixas de pH e com produtos químicos, podendo interferir na atividade da lipase.

Aplicando a técnica de imobilização por ligação covalente WU *et al.* (2009), preparou nanopartículas de Fe₃O₄ e quitosana para a imobilização da lipase de *Candida rugosa*, obtendo uma perda de atividade de apenas 12%, após cinco ciclos de reuso. Enquanto NAGAR *et al.* (2012) utilizaram óxido de alumínio ativado com glutaraldeído para a imobilização por ligação covalente da xilanase de *Bacillus pumilus*, obtendo uma alta atividade catalítica.

Aprisionamento

O aprisionamento nada mais é do que criar armadilhas físicas para as enzimas dentro de uma membrana porosa. A metodologia especialmente aplicada a biomoléculas lábeis, como as enzimas, que podem degradar, ou perder a atividade em condições extremas de temperatura, pH e reagentes.

O aprisionamento em suportes nanoestruturados como as nanofibras de eletrospun, zircônia e materiais como a prístina têm sido muito utilizados na imobilização, devido a sua ampla faixa de aplicações na química fina, biomedicina, biosensores e biocombustíveis (WANG *et al.*, 2009). Suportes como a quitosana, sílica mesoporosa, nanopartículas magnéticas e carragena também são muito utilizados nesse tipo de imobilização (GUPTA *et al.*, 2013; DATTA *et al.*, 2013). WANG *et al.* (2012) utilizaram a técnica de aprisionamento para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em partículas de zircônia.

Ligação Cruzada

A ligação cruzada é uma técnica de imobilização muito utilizada, onde a enzima pode fazer ligação cruzada uma com a outra ou na presença de proteínas funcionalmente inertes, como a albumina de soro bovino. É um método atraente devido a sua simplicidade e a ligação química forte conseguida entre as biomoléculas. A principal desvantagem é a possibilidade de perdas de atividade, devido à distorção da conformação da enzima ativa e as alterações químicas do sítio ativo durante a imobilização (SASSOLAS *et al.*, 2012). WU *et al.* (2009), utilizaram nanopartículas de Fe₃O₄ e quitosana para a imobilização da lipase de *Candida rugosa* por ligação cruzada.

Afinidade

A técnica de imobilização por afinidade explora a especificidade da enzima no seu suporte sob diferentes condições fisiológicas. Pode ser realizada de duas formas: a) quando a matriz é previamente acoplada num ligante com afinidade para a enzima alvo, b) quando a enzima é conjugada a algum material que possa desenvolver afinidade pela matriz (DATTA *et al.*, 2013).

Segundo SASSOLAS *et al.* (2012), a estratégia dessa técnica de imobilização é criar (bio)laços de afinidade entre um suporte ativado (com: lectina, avidina, quelatos metálicos, etc.) e um grupo específico da sequência de proteína (com: biotina, histidina, etc). Esse método permite controlar a orientação da biomolécula de modo a evitar a desativação da enzima e/ou bloqueio dos sítios ativos.

Adsorventes de afinidade estão sendo muito utilizados para a purificação simultânea de enzimas. Suportes com afinidade complexa como a quitosana, esferas de sílica porosa revestidas, agarose ligada à multicamadas de concanavalina, etc. E uma série de outras enzimas que podem ser utilizadas neste método de imobilização, para o aumento da estabilidade e eficiência catalítica (DATTA *et al.*, 2013). LEE *et al.* (2009), estudaram diversos tipos de materiais mesoporosos para a imobilização de enzimas, ressaltando que a imobilização de óxidos metálicos como CuO e ZnO é muito utilizada devido a alta estabilidade enzimática.

Uma alternativa na aplicação da metodologia é o uso de aditivos para a modificação de suportes para a imobilização de enzimas a fim de obter maior estabilidade térmica e/ou operacional (SPERANZA *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2012b).

3.3 Aditivos para Biocatalisadores Imobilizados

Aditivos como solventes orgânicos e inorgânicos (PEG, líquido iônico, Triton X, entre outros) são muito utilizados na catálise enzimática para acelerar o processo da reação ou modificar a estrutura do suporte. Embora possuam uma grande disponibilidade comercial e possam ser obtidos a um custo razoável, em relação às questões de volatilidade, toxicidade e

possibilidade de contaminação ambiental a utilização desses solventes pode ser reduzida no futuro. Tendo em vista essas questões faz-se necessário pensar em outras alternativas, como os líquidos iônicos (LIs). Os LIs são sais orgânicos, com baixo ponto de fusão, compostos de íons (cátions e ânions) que recentemente tem atraído muito interesse por apresentarem propriedades únicas como alta condutividade iônica, não volatilidade, não ser inflamável, possuir baixa pressão de vapor, capacidade de solvatação e alta estabilidade térmica e química. Podem ser produzidos com a combinação de diferentes cátions e ânions, como demonstrado na Figura 6 (CHAURASIA *et al.*, 2011; FAUZIN & AMIM, 2012).

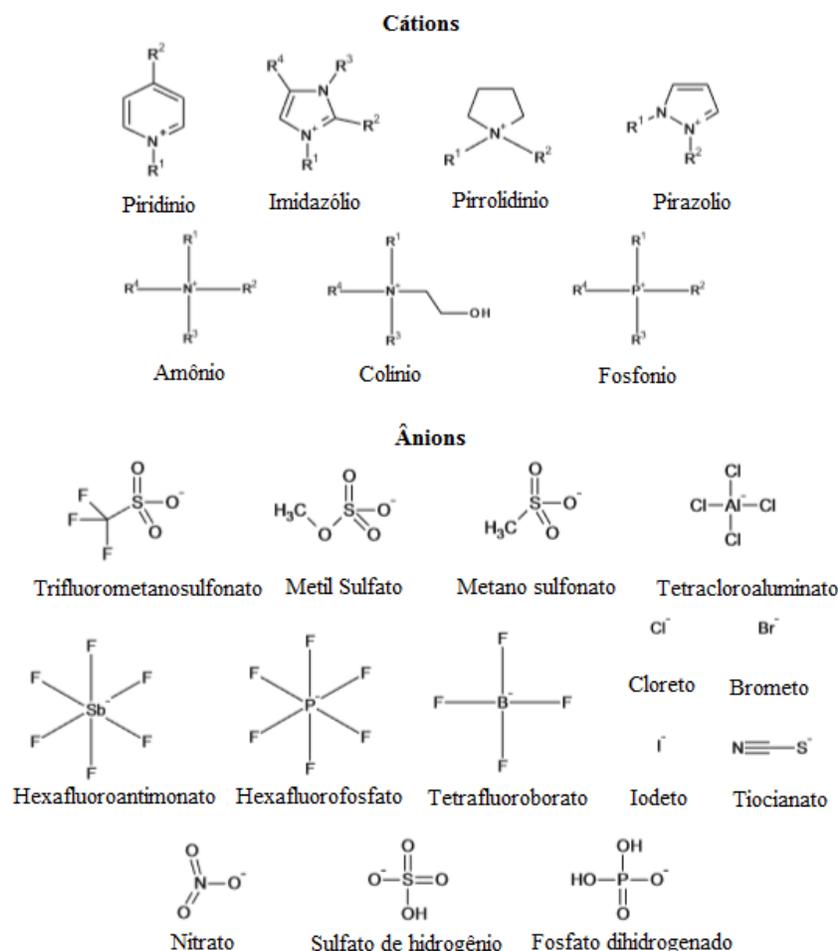


Figura 6. Cátions e ânions mais comuns utilizados na síntese dos LIs (FAUZIN & AMIM, 2012).

Os LIs podem ser classificados em dois tipos: Líquidos Iônicos Apróticos (LIA) e os Líquidos Iônicos Próticos (LIP). Os próticos são obtidos a partir de aminas, ácidos orgânicos e inorgânicos, sendo de maior interesse industrial devido a possuírem um próton altamente móvel, em adição às propriedades clássicas obtidas pela mudança do ânion ou cátion com diferentes cadeias alquílicas (ÁLVAREZ *et al.*, 2010). Os apróticos são constituídos principalmente de cátions orgânicos a base de imidazólio, piridino, tetraalquilamônio e tetraalquilfosfônio, apresentando elevado custo de síntese, dificultando sua aplicação industrial (ZARCULA *et al.*, 2009).

Os líquidos iônicos próticos (LIPs), compõem um subconjunto de LIs formados pela combinação estequiométrica de um ácido de Bronsted com uma base de Bronsted e são caracterizados pela sua grande capacidade de interações químicas, incluindo a aceitação e a doação de prótons. Por eles serem facilmente preparados e apresentarem baixo custo os LIPs podem ser utilizados em várias aplicações industriais, como em: células combustíveis eletrolíticas, reações de biocatálise (MAXIMO *et al.*, 2013; ANOUTI *et al.*, 2010).

A utilização dos LIs puros ou misturados com solventes orgânicos são amplamente recomendados para reações de biocatálise por apresentar alta atividade enzimática, estabilidade e seletividade, oferecendo a possibilidade de combinar vantagens como na imobilização de suportes metálicos com líquidos iônicos, criando centros tri-dimensionais livres (HU *et al.*, 2012b; ZHAO *et al.*, 2010). Segundo HARA *et al.* (2010) e Souza *et al.* (2013) o uso de LIs no processo de imobilização podem estabilizar as enzimas, protegendo a camada de hidratação ao seu redor e/ou pela mudança permanente da ativação conformacional.

KIM *et al.* (2012), estudando a reação de transesterificação de álcoois na presença de acetato de vinilo em [emim] BF₄ e [bmim] PF₆ utilizando lipase *Candida antarctica* (imobilizada) e lipase de *Pseudomonas cepacia* (nativa) como biocatalisadores, relatou que as lipases foram até 25 vezes mais enantioseletivas em líquidos iônicos do que em solventes orgânicos convencionais.

De acordo com FAUZI *et al.* (2012), os LIs são muito utilizados como catalisadores em suportes inorgânicos que podem ser inertes ou participar da reação catalítica, onde o LI é fixado no suporte, proporcionando sítios para a reação ocorrer. A reação pode ser aumentada pela utilização de suportes com alta área superficial tais como os materiais porosos. Alguns suportes metálicos como a alumina (KUMAR *et al.*, 2013; NAGAR *et al.*, 2012), sílica (SOUZA *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2012a), zeólitas (MITCHEL *et al.*, 2011), entre outros suportes, são utilizados com a modificação da sua superfície por aditivos como os LIs.

A utilização do LI como aditivo no processo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em alumina, verificada por HARA *et al.* (2010), influenciou de forma positiva na eficiência catalítica do biocatalisador imobilizado, utilizando os líquidos iônicos 1-etil-3-metilimidazolio ([EMIM][BF₄]) e 1-butil-3-metilimidazolio trifluorometanosulfonato [BMIM][TfO] quando comparados com o controle. Proporcionando um aumento da área superficial e volume de poros do suporte.

Neste intuito, o uso de suportes modificados com diferentes aditivos e/ou estabilizantes na imobilização de enzimas podem assegurar o aumento da estabilidade e reutilização da enzima e, conseqüentemente, melhor a relação custo-benefício do processo. Portanto, se o suporte for criteriosamente selecionado pode-se também aumentar o tempo de meia-vida, isto é, a estabilidade operacional. Contudo, caso essa estratégia seja feita de forma inadequada poderá afetar adversamente a estabilidade e o desempenho global do sistema imobilizado (CARVALHO *et al.*, 2015)

3.4 Suportes para imobilização

A seleção do suporte deve ser considerada tão importante quanto à escolha do método de imobilização a ser utilizado, para isso algumas precauções devem ser tomadas, uma vez que, após a imobilização, o suporte será o principal constituinte do microambiente em que a enzima será imobilizada. Portanto, deve-se levar em consideração a aplicação do biocatalisador imobilizado, a análise das propriedades físicas e químicas do suporte, bem como a sua reutilização (SILVA, 2012).

Para a seleção do suporte alguns itens devem ser observados, tais como: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outras. Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos (Tabela 3), e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2009).

Tabela 3. Suportes frequentemente utilizados em imobilização (MILETIC *et al.*, 2012; RAHMAN *et al.* 2008).

Suporte	Vantagens	Desvantagens	Amostras
Suportes Inorgânicos	Maior estabilidade em suportes orgânicos.	Pode ocorrer abrasões sobre agitação.	Sílica, derivados da sílica, celite, alumina
Suportes orgânicos de fontes naturais	Boa compatibilidade com enzimas.	Ligações pobres e fraca estabilidade mecânica.	Polissacarídeos
Suportes orgânicos sintéticos	Suportes personalizados	Transferência de massa sólido-líquido, difusão limitada.	Polímeros Sintéticos

A diferença entre a ligação da enzima com o suporte vai depender do tipo de suporte utilizado. No entanto, não há nenhum suporte que sirva como estrutura ideal para a imobilização de enzimas (DHAKE *et al.*, 2013). A imobilização de enzimas em suportes sólidos tem sido fundamental para o desenvolvimento da biotransformação, pois é uma das melhores maneiras de melhorar sua atividade e enantioseletividade, produzindo assim eficientes biocatalisadores estáveis que podem ser reutilizados em aplicações em larga escala (CHEN *et al.*, 2009).

As propriedades do suporte podem influenciar na adsorção, conformação, e na atividade das enzimas imobilizadas. A superfície química e o seu tamanho impactam na natureza da enzima e do substrato, e na interface do suporte. Isso porque a sua modificação é frequentemente mais fácil, mais barata e menos prejudicial do que a modificação das enzimas. As técnicas que alteram as propriedades dos materiais são mais frequentemente exploradas pela tecnologia de imobilização. Ao manipular as propriedades do suporte, a conformação da enzima imobilizada e/ou a atividade pode ser mantida ou aumentada (TALBERT e GODDART, 2012).

A utilização de partículas inorgânicas como suporte para a imobilização é particularmente relevante para reações em fase orgânica devido à sua excelente estabilidade química e inércia em

meios orgânicos. Muitos materiais inorgânicos podem ser facilmente fabricados na forma de nanopartículas com áreas superficiais elevadas, facilitando com isso a dispersão das enzimas nas reações interfaciais (CHEN *et al.*, 2009).

Segundo GUTMANN *et al.* (2013), em muitos dos suportes inorgânicos, as ligações das moléculas contêm grupos funcionais que ficam aderidos na superfície dos suportes sólidos por meio da imobilização por ligação covalente. Essas condições podem ser satisfeitas tanto pelos compostos orgânicos poliméricos quanto pelos óxidos inorgânicos.

No entanto, segundo MAHMOOD *et al.*, (2008), o desempenho das lipases após a imobilização nessas matrizes inorgânicas, tais como sílica, silicato de alumínio ou magnésio e óxido de ferro têm sido afetado pela imobilização em muitos estudos envolvendo reações em meio orgânico. Esse fenômeno pode estar associado com as propriedades estruturais da maioria das lipases, especialmente à cadeia de polipeptídeo “tampa”, que cobre o sítio catalítico da enzima. Quando a imobilização ocorre em suporte inorgânico que possui caráter hidrofílico, a lipase usualmente exibe um equilíbrio entre a forma fechada e aberta, o que evita a ativação interfacial pela interface externa. Segundo DE LATHOUDER *et al.*, (2006), existe um método simples para contornar essa situação, que é a modificação da superfície do suporte inorgânico com espécies hidrofóbicas (octil, octadecil, trioleína, entre outros) para induzir uma alteração estrutural da “tampa”, expondo assim o sítio catalítico para o meio de reação, na forma aberta.

Os suportes inorgânicos apresentam algumas vantagens, como: facilidade de regeneração e reutilização, no caso de desativação da enzima imobilizada, reduzindo assim o custo do suporte; controle das propriedades da superfície e de sua estrutura; grande área superficial; comportamento hidrofílico ou hidrofóbico e interações eletrostáticas, bem como resistência química e mecânica (ZHENG *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2013).

Diversas matrizes inorgânicas foram utilizadas para imobilizar lipases, tais como: nanopartículas de zircônia (CHEN *et al.*, 2009); grânulos de vidro poroso/não poroso (BÓDALO *et al.*, 2008); nanopartículas de titânio (HOU *et al.*, 2013); toyonita (KAMORI *et al.*, 2000); monolitos de carbono micro-/macroporoso (LUANGON *et al.*, 2012; QUIRÓS *et al.*,

2011) carbono mesoporoso (RAMANI *et al.*, 2010; HARA *et al.*, 2010); sílica mesoporosa (HU *et al.*, 2012a) zeólitas mesoporosas (MITCHELL e RAMÍREZ, 2011); nanocompósitos de zinco e ouro (WANG *et al.*, 2009); óxidos de alumínio, zinco e magnésio (KUMAR *et al.* 2013; HUSAIN *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011).

A ligação das enzimas com o suporte sólido é geralmente realizada por ativação inicial da superfície utilizando reagentes multifuncionais, como por exemplo, o glutaraldeído e a carbodiimida, seguido do acoplamento da enzima ao suporte ativado, e por fim a remoção do excesso das biomoléculas não ligadas (SASSOLAS *et al.*, 2012).

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. A seleção criteriosa de um suporte, se por um lado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema (MENDES *et al.*, 2011).

Os materiais inorgânicos além de serem compostos por materiais de diversas origens, também podem diferir no tamanho dos seus poros. Os poros dos suportes sólidos são classificados quanto ao tamanho, de acordo com a União Internacional de Química Pura (IUPAC). Na Tabela 4, estão relacionados os tipos de poros existentes e seus respectivos diâmetros.

Tabela 4. Classificação dos poros segundo a IUPAC.

Tipo de poro	Diâmetro
Macroporo	Maior que 500 Å (50 nm)
Mesoporo	Entre 20 e 500 Å (2 até 50 nm)
Microporo	Entre 6 e 20 Å (2 nm)
Ultramicroporos	Menor que 0,06 Å nm (0,6nm)

Suportes Nanoporosos

O recente interesse em nanotecnologia tem proporcionado um avanço nos estudos referentes a imobilização de enzimas, devido às suas potenciais aplicações nas áreas de biotecnologia e biomédica. Os materiais nanoestruturados exibem propriedades interessantes tais como grande superfície em relação ao volume, alta atividade na superfície da reação, alta eficiência catalítica e forte capacidade de adsorção que lhes transmite potencial para desempenhar um papel importante na imobilização de enzimas. A grande área de superfície dos nanomateriais proporciona uma melhor imobilização enzimática, pois aumentam a sua carga de enzima por unidade de massa. Além disso, a fixação das moléculas enzimáticas na superfície do nanomaterial reduz o desdobramento da proteína, resultando numa melhoria da sua estabilidade (HUSAIN *et al.*, 2011; ANSARI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2009).

WEI e colaboradores (2011), no seu estudo para a fabricação solvotérmica de polímeros monolíticos adsorvidos com grandes nanoporos para imobilização de biomoléculas, demonstraram na síntese desses polímeros com os grupos funcionais carboxil/amido que estes materiais têm abundância de nanoporos e elevadas área superficial fazendo com que tivessem uma excelente propriedade de adsorção da enzima de mioglobina, sendo, portanto, potencialmente significativa na imobilização de enzimas.

Suportes Mesoporosos

Os materiais mesoporosos apresentam propriedades texturais únicas que os tornam muito atraentes como suportes de enzimas, ou seja, alta especificidade das áreas de superfície (até cerca de $1500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) e diâmetros de poro que estão perto do diâmetro das moléculas da enzima, (até cerca de $1,5 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), tornando-os ideais para a imobilização (LEE *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2012a; QUIRÓS *et al.*, 2011).

Segundo JALADI *et al.*, (2009), estes materiais cumprem muitos dos requisitos para serem portadores de enzimas, como: grande área de superfície, caráter hidrofílico, habilidade de adaptação da estrutura e textura dos poros para atender as necessidades de imobilização de

enzimas (por meio da adição de surfactantes e ajustando as condições de síntese, levando a uma localização precisa das biomoléculas.), insolúvel em água, estabilidade química e térmica, resistência mecânica, segurança toxicológica e regenerabilidade. A adsorção da enzima por esses materiais pode ser controlada por vários fatores, como o pH da solução, a força iônica e a química da superfície do suporte (SANTALLA *et al.*, 2011).

HU *et.al.*, (2012a), utilizaram como suporte a sílica mesoporosa na imobilização por ligação covalente da peroxidase de lignina. Apresentando resultados satisfatórios, já que a enzima imobilizada na sílica mesoporosa apresentou melhores parâmetros de pH e termoestabilidade que a enzima livre, obtendo uma perda de rendimento somente após o quinto ciclo.

No trabalho realizado por SANTALLA *et al.* (2011), imobilização de enzimas utilizando sílica mesoporosa, foi estudado o efeito da utilização de três tipos de enzimas diferentes *Candida antarctica B* (superfície hidrofóbica), Peroxidase de raiz forte e lacase (superfícies hidrofílicas), com diferentes pontos isoelétricos, sobre a estrutura final da sílica mesoporosa (tamanho, estrutura da superfície de proteínas). Chegando às seguintes conclusões: se a superfície da proteína for hidrofóbica o material sílico é sintetizado, mesmo na presença de interações eletrostáticas. Quando a superfície do suporte é hidrofóbica suas interações prevalecem e a estrutura certa é formada. Se a superfície é hidrofílica então as interações eletrostáticas podem ser a força motriz do processo

Existem muitos estudos na literatura com suportes inorgânicos e imobilização de enzimas, principalmente sílica mesoporosa. No entanto, apenas poucos estudos sobre a utilização de óxidos metálicos, principalmente os óxidos de alumínio (alumina), de zinco e magnésio como suportes de enzimas para aplicação em biocatálise (KUMAR *et al.*, 2013; NAGAR *et al.*, 2012).

3.4.1 Óxidos Metálicos

Os óxidos metálicos são uma importante classe de catalisadores heterogêneos que devido ao seu alto nível de quimio-seletividade, compatibilidade ambiental, simplicidade de operação e

disponibilidade a baixo custo, são conhecidos por suas aplicações industriais como adsorventes, catalisadores e suportes de biocatalisadores (THAKURIA e BORAH, 2007; SEKIZAWA *et al.*, 2000; THAKURIA *et al.*, 2007).

A preparação dos óxidos metálicos envolve uma série de etapas complexas, que fazem com que uma pequena variação nos detalhes preparativos interfira drasticamente nas suas propriedades finais. Segundo FIERRO (2005), a preparação dos suportes é tão crítica que depende da reatividade e estabilidade da reação. A taxa de transformação de um reagente ou a formação de um produto de interesse é função do número de centros ativos acessíveis às moléculas do reagente. Portanto, é necessário o conhecimento sobre como os métodos de preparo reagem sobre a natureza e a distribuição das fases ativas, da morfologia e textura dos suportes.

Segundo FIGUEIREDO *et al.* (1989), para um bom funcionamento do suporte é indispensável o conhecimento da sua composição. A caracterização físico-química do suporte é de fundamental importância para poder explicar e prever propriedades como atividade, seletividade e estabilidade.

O estudo da imobilização de enzimas em matrizes de óxidos é relevante, pois pode fornecer uma correlação entre a morfologia e as propriedades da enzima que iria ajudar ainda mais no seu entendimento. Para atingir esse objetivo os parâmetros iniciais necessitam ser bem definidos para que a sua morfologia possa ser controlável, isto é, as condições de reação sejam padronizadas, independentemente da enzima de interesse (SALAS *et al.*, 2012; BETANCOR, 2008).

A morfologia da matriz inorgânica também pode ser variada para criar estruturas mais funcionalizadas e tridimensionais. Ao controlar a morfologia específica, proporciona a oportunidade para modificar a área de superfície para a catálise e, potencialmente, controlar as propriedades de transferência de massa da matriz para substratos e produtos específicos (LUCKARIFT *et al.*, 2004).

Embora a imobilização de enzimas em matrizes inorgânicas era limitada principalmente à utilização de sílica, a sua síntese biológica pode levar a uma variedade de novas matrizes para imobilização de enzimas, como por exemplo o óxido de titânio que também pode ser utilizado como uma matriz de imobilização (BETANCOR, 2008). Experiências preliminares como as de ANSARI *et al.* (2012), RAHMAN *et al.* (2008), ZHU *et al.* (2014), WANG *et al.* (2012), ANSARI e HUSAIN (2011), mostraram a encapsulação bem sucedida de uma variedade de enzimas, nesses componentes não-biológicos tais como a platina, cobalto magnético, as nanopartículas de CdSe / ZnS, nanopartículas de óxido de ferro, alumina, óxido de zinco, óxido de magnésio, etc.

3.4.1.1 Óxido de Zinco

O óxido de zinco (Figura 7) é considerado um material semicondutor polar com dois planos cristalográficos que possuem polaridade oposta e superfície com energia diferente, que levam a uma maior taxa de crescimento na formação de estruturas verticais (ARYA *et al.*, 2012).

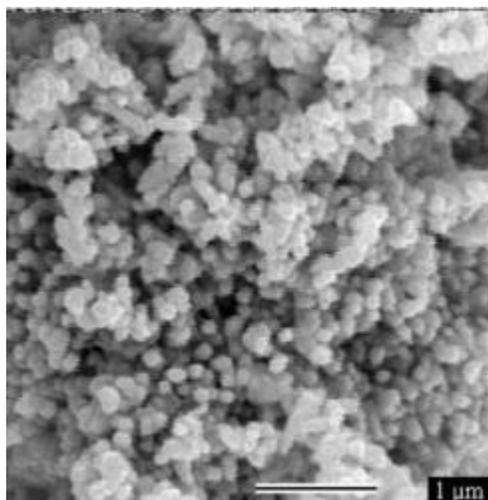


Figura 7. Micrografia do ZnO (SILVA *et al.*, 2010).

Do ponto de vista tecnológico o ZnO é um importante material multifuncional que possui amplas aplicações, como UV-lasers, UV- fotodetectores, sensores de gás, sensores químicos, biosensores e células solares (PARK *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2012). Além disso, devido à sua

biocompatibilidade, podem ser utilizados como anti-bactericida, no tratamento do câncer, em bioimagem, produtos médicos, protetores solares, e loções para a pele. A excelente capacidade de comunicação eletrônica, e estabilidade química com alto potencial isoelétrico (aproximadamente 9) faz com que o ZnO seja um atrativo como matriz para aplicações em biosensores (WANG *et al.*, 2012; ANSARI *et al.*, 2012).

RAHMAN e colaboradores (2008) utilizaram como suporte para a síntese de ésteres metil adipato, com lipase de *Candida rugosa*, os hidróxidos de Mg, Zn e Ni, utilizando a adsorção física como método de imobilização. Obtendo um rendimento (carga de proteína) de 71% (Mg/Al-NO₃), 67% (Zn/Al-NO₃), e 58% (Ni/Al-NO₃), respectivamente devido à maior área de superfície, a porosidade e espaçamento basal dos suportes.

SHANG *et al.* (2014), no seu estudo de imobilização da lipase de *Candida antártica* em uma mistura de sílica macroporosa e nanotubos de ZnO, conseguiram excelentes resultados, com uma estabilidade operacional de 15 reusos, mantendo uma atividade relativa de 96,9%, devido à excelente estabilidade térmica do ZnO, onde mesmo às altas temperaturas (65°C) o suporte permanecia química e morfologicamente inalterado.

3.4.1.2 Óxido de Alumínio

O óxido de alumínio (Al₂O₃), também conhecido por alumina, é um óxido que possui forte ligação iônica interatômica, propriedade esta que faz com que o suporte adquira as características do material desejado. Apresenta algumas aplicações, como por exemplo: em lâmpadas de sódio-vapor e dispositivos de filmes finos. Sendo um dos seus usos mais recentes, como suporte para imobilização de enzimas. (FRENCH *et al.*, 1998).

As membranas de alumina (Al₂O₃), devido a sua notável dureza, resistência a solventes orgânicos, uniformidade do tamanho do poro, alta densidade de poros e seu baixo custo, oferece inúmeras vantagens como: suporte para biocatalisadores, anticorpos e células imobilizadas; biosensores e sensores químicos; catálise e biocatálise; armazenamento de energia; separação de moléculas, etc. (Figura 9). Na área ambiental as membranas funcionalizadas são tipicamente

utilizadas para a limpeza de águas residuais, como por exemplo: a remoção de bactérias, de compostos orgânicos, bem como para a separação de emulsões óleo-água (TRECANNI *et al.*, 2013).

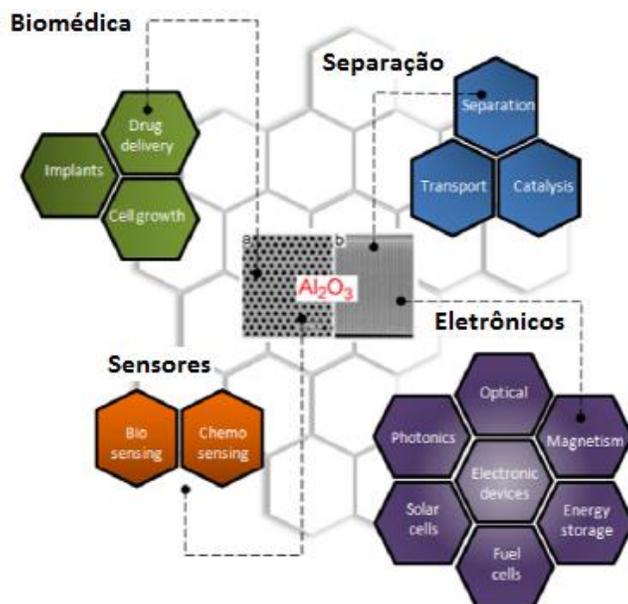


Figura 9. Esquema mostrando as áreas que têm maiores aplicações dos materiais nanoestruturados de alumina (JANI *et al.*, 2013).

Segundo POPAT *et al.* (2004), as membranas de alumina nanoporosas representam uma alternativa ao silício e às membranas poliméricas, pois são fáceis de fabricar, são química e termicamente estáveis, inertes e podem produzir uma variedade de tamanho e distribuição dos poros (Figura 10).

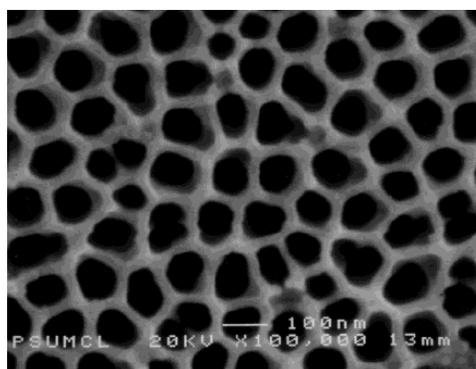


Figura 10. Micrografia (MEV) da membrana de Al_2O_3 nanoporosa, com tamanho de poro de 72 nm (POPAT *et al.*, 2004).

A alumina anódica nanoporosa apresenta uma estrutura de membranas com poros extremamente lineares e paralelos que se estende por toda a membrana, resultando em excelentes propriedades de fluxo. Esse material está comercialmente disponível com um diâmetro de poro de 100-200 nm. Como consequência disso, o interior da membrana ou da pilha de membranas permanece estéril, e as distâncias de difusão do substrato permanecem as mesmas. Fazendo com que as propriedades de transferência de massa sejam superiores a muitos outros materiais. Sendo as técnicas de imobilização de enzimas com alumina, iguais à imobilização em suportes de sílica (JANI *et al.*, 2013).

KUMAR *et al.* (2013), utilizaram como método de imobilização da lipase de *Bacillus sp.*, a ligação covalente, tendo como suporte pellets de óxido de alumínio. Obtendo um rendimento de imobilização dos BIs em torno de 78%, com reciclo de cinco vezes sem reduzir a atividade enzimática. A redução foi observada após 13 ciclos de reuso com a diminuição de 28%.

KJELLANDER *et al.* (2013), estudaram a cinética do sistema de fluxo, triagem e estabilidade da imobilização da transferase glutatione em suportes nanoporosos de alumina anodizada pelo método de ligação covalente. Concluíram que trabalhar com enzimas imobilizadas num reator de leito fixo apresenta inúmeras vantagens, como: economia e estabilidade das enzimas e uma melhoria na reprodutibilidade dos experimentos. As membranas de alumina nanoporosas apresentaram uma quantidade alta de enzima por volume, boas propriedades de fluxo e possibilidade de design modular com arranjo sequencial das enzimas em sistemas multi-enzimas.

Capítulo IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo está descrito em forma de dois artigos científicos e uma patente e estão organizados conforme as normas propostas pelo periódico da publicação e o INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial). O capítulo é composto pelos seguintes tópicos: Introdução, Materiais e Métodos utilizados para o desenvolvimento dos experimentos, Resultados e Discussões obtidos e a Conclusão.

No artigo 1: Immobilization of lipase on organometallic support in the presence of different additives, é verificado o comportamento da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em ZnO. Este artigo será submetido ao *International Journal of Biological Macromolecules*.

No artigo 2: Improved enzymatic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized in Al₂O₃ modified with protic ionic liquids. Neste artigo é observado através da caracterização a influência dos líquidos iônicos próticos na modificação do óxido de alumínio e conseqüentemente na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*. Este artigo será submetido ao *International Journal of Biological Macromolecules*.

Patente: Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em óxido de magnésio com finalidade cosmética.

ARTIGO 1

Immobilization of lipase on organometallic support in the presence of additives

I.C. Feitosa¹, L.M.S. Brandão¹, R.E. Strappa¹, M.S. Santos¹, R.M. Santos³, L.S. Freitas³, S. Mattedi⁴, Á.S. Lima^{1,2}, C.M.F. Soares^{1,2}, R.T.Figueiredo^{1,2*}

¹Universidade Tiradentes-UNIT, Aracaju SE, 49030-270 Brazil; ²Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, Aracaju SE, 49030 -270 Brazil; phone/ fax: 55 79 3218 2190; e-mail: renantf@infonet.com.br; ³ Universidade Federal de Sergipe-UFS, ⁴Universidade Federal da Bahia-UFBA.

* To whom correspondence should be addressed:

Tel: +55 7932182190 e-mail address: renantf@infonet.com.br

Abstract

The selection of the support should be considered as important as the choice of immobilization method used, since, after immobilization, the support will be the major constituent of the microenvironment in which the enzyme will be immobilized. The study of the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) in organometallic support is relevant because it can provide a correlation between the morphology and properties of the enzyme that would further help in your understanding. Therefore, the aim of this study was to characterize the immobilized biocatalyst by covalent binding in ZnO in the presence of additives, like ionic liquids. The best yield of immobilization was obtained for the load of 0.1 g/g of support enzyme, of 166% for BCL ZnO modified with diethanolamine acetate (BHEAA), as for BCL ZnO modified with monoethanolamine acetate (2HEAA) and BCL ZnO modified with methyl monoethanolamine acetate (2mHEAA), were of 86% and 62% obtained for the load of 0.3 g/g of support enzyme, respectively. As for the immobilized BCL in ZnO, in the absence of additives was made a immobilization yield of 52% for the loading of 0.3 g/g of support enzyme.

Keywords: enzyme, immobilization, additives, organometallics supports.

1. Introduction

Among the principles of the need for sustainable development will have to rule that the chemical should maintain and improve the quality of life. The major challenge is the continued development, reducing damage to the environment. This new way to be outlined by the chemical is termed as sustainable chemistry or green chemistry: "The creation, development and application of chemical products and processes that reduce or eliminate the use and generation of hazardous substances [1].

One of the important steps in the concept of green chemistry seconds [2], it is the development and optimization of catalytic processes, to minimize the use of tons of solvents and generation of by-products in the pharmaceutical and fine chemical, constitutes one of the major sources of industrial pollution, leading to severe environmental damage.

The use of enzymes as biocatalysts corroborates these principles, as compared to traditional chemical catalysts, enzymes have many benefits that make their use a viable alternative in industrial applications. However, it has challenges to be overcome for use on an industrial scale due to their high cost, difficulty in separation from the reaction medium and denaturation of the structure due to the severe conditions of temperature, pH, agitation, among others [3,4].

Enzymes are catalysts of biological origin with high potential in different industrial areas due to its high selectivity, specificity and activity of mild conditions [5]. Enzyme immobilization is advantageous for commercial applications due to its ease of manipulation and separation, reuse, low production cost and a possible increase of the thermal stability and operational stability [6]. A material to be used as supports for the immobilization of enzymes should present some morphological characteristics and specific chemical, such as (i) grain size, (ii) distribution, and pore size, (iii) specific surface area and (iv) size distribution and pore volume. On the other hand, must also possess a mechanical resistance, microbial resistance, thermal stability, chemical stability and high capacity of the enzyme. There are several types of materials used as supports, for example, celite, silica gel, metal

oxides (ZnO, TiO₂, MgO, Al₂O₃, Fe₂O₃, CaO, etc), zeolites (Si/Al, Cu/P, Zn/P, Ni/P) and polymeric resins (Accurel XP-100) [7,8].

The support can influence the adsorption properties, conformation, the interaction of enzyme and carrier and the activity of immobilized enzymes. The surface chemistry and size of the pores of the support influence the nature of the enzyme and the substrate material interface. The support modification is often easier, cheaper and less harmful than the enzyme modification. By manipulating the properties of the support with the use of additives, the activity can be increased and the conformation of the enzyme may be retained [9]. Some types of additives are used for modifying substrates, such as albumin, PEG, cyclodextrin, Triton X-100, ionic liquids, among others.

The preparation of catalysts using additives have been introduced for support modification as well as for an increase of the enzymatic activity [10,11]. The additives have some advantages in relation to their properties, as: the potential to be reused and recycled, negligible vapor pressure and high polarity [12]. The organometallic supports are an important class of heterogeneous catalysts because of their high level of chemoselectivity, environmental compatibility, simplicity of operation and availability at low cost, are known for their industrial applications [13,14].

The literature reports that immobilized biocatalysts have desirable features compared to the free enzymes, are more easily retrievable, more stable and catalytically active and insoluble in the reaction medium. However, the researcher must develop a scientific approach in choosing the support to be used for immobilization. The application of metal oxides, such as Al₂O₃, TiO₂, ZnO, Fe₃O₄, and MgO are of particular interest because they are not only stable under adverse conditions, but also are generally regarded as safe materials for humans, animals and plants, according to therefore, the principles of green chemistry to generate fewer toxic wastes and effluents [15].

The importance and the interest of the use of metal oxide technology, have shown catalytic potential in the studies reported in the literature [16,17,18]. In general the metal oxides are used as UV-lasers, UV-photodetectors, gas sensors, chemical sensors,

biosensors, solar cells, bio-imaging, medical products, sunscreens, nanotubes, skin lotions, etc. [19,20].

There is not in literature studies from zinc oxid modification by ionic liquid used for enzyme immobilization, because of this, this study aims to characterize by DRX, MEV, BET, TGA/DTA and FTIR the immobilized biocatalysts by covalent bond in ZnO in the presence of additives, using the *Burkholderia cepacia* lipase is being developed for a better understanding of the behavior between the biocatalyst and organometallic supports.

2. Experimental

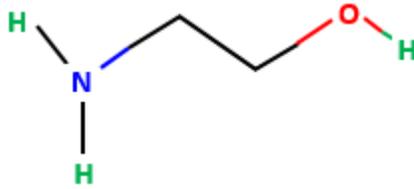
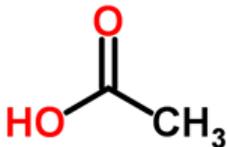
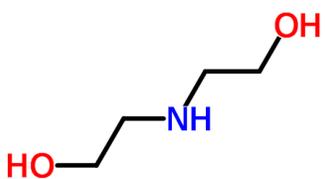
2.1 Materials

The organometallic support ZnO was produced using the precursor sodium carbonate and zinc nitrate were purchased either from Vetec Quimica Fina *Ltda*. The silane precursor 3-Aminopropyltriethoxysilane (γ -APTS) and activate predursor Glutaraldehyde were purchased from Sigma-Aldrich. Microbial lipase of *Burkholderia cepacia* (LBC) was purchased from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA).

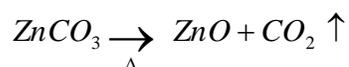
2.2 Organometallic support ZnO

For the preparation of organometallic support ZnO it was used a certain volume of the precipitating agent Na_2CO_3 (Sodium Carbonate) in a water bath at a temperature of +/- 60°C, under mechanical stirring, in the absence (control) or presence of these protic ionic liquids (PILs): Methyl-monoethanolamine acetate (2mHEAA); Monoethanolamine acetate (2HEAA) and Diethanolamine acetate (BHEAA) - ZnO (2mHEAA), ZnO (2HEAA) e ZnO (BHEAA), respectively (Table 1).

Table 1Chemical formula of anions and cations of PILs and the *log P* [21].

ANION	CATION	CODE
	Monoethanolamine	
		2HEAA
	log P = - 1.61	
	Methyl monoethanolamine	
Acetic Acid		2mHEAA
	log P = - 1.15	
	Diethanolamine	
log P = 0.09		BHEAA
	log P = - 1.71	

The pH of the formed solution was maintained between 8.0 to 8.5 by adding Na_2CO_3 when it was necessary. After the process of forming the precursor, it was brought to the reactor for calcination for 7 h at a temperature of 350 °C. The support reactions are listed below:



2.3 Immobilization of the biocatalyst by Covalent Binding

For the immobilization of the biocatalyst by covalent binding, the support ZnO was left immersed in γ -APTS 0.5% (v / v) for 3 h at a temperature of 75°C under stirring in rotary evaporator. After this period, the support was washed with heptane and dry in the oven for a period of 15 h at a temperature of 105°C. After silanization of the support, it was placed immersed in glutaraldehyde (GLU) for 10 minutes. After activation, the enzyme solution of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) was inserted, with a variation of its loading for each immobilization (0.1, 0.2, 0.3 and 0.4g_{enzyme}/g_{support}) under mild agitation for a period of 3 h.

2.4 Lipolytic activity

The unit of activity was defined as the amount of enzyme which liberates in 1 μ mol of fatty acid per minute of hydrolysis reaction. The immobilization yield (Ya) was determined by the unit of total hydrolytic activity present on the support and unit of hydrolytic activity offered for immobilization [22].

2.5 Physical-Chemical and Morphological Characterization

Thermal Gravimetric Analyses (TGA) and Differential Thermal Gravimetry (DTG) results were obtained simultaneously on a DTA-TG Apparatus, on Shimadzu. BCL free, ZnO control, BCL ZnO (2HEAA), BCL ZnO (BHEAA) and BCL ZnO (2mHEAA) samples were heated from room temperature to 1000°C at heating rate of 10°C/min, under a constant nitrogen flow rate of 50 mL/min. The N₂ adsorption-desorption experiments were carried out using a Quanta Chrome Multistation Instruments, Autosorb 3B with a vacuum system (10⁻³Torr), the immobilized samples were submitted to a thermal treatment at 100°C for 48°C, to eliminate any water existing within the pores of the solids. The samples were degassed at 300°C for 12h before the measurement. The specific surface area was calculated using the Brunauer-Emmet-Teller method. The pore volume and size were calculated by Barrett-Joyner-Halenda model based on the adsorption isotherm. Small-angle X-ray patterns were obtained using a Shimadzu, XRD-6000, advance diffractometer with

CuK α ($\lambda = 1.5405\text{\AA}$), radiation at 40kV e 30 mA in a range of 10-80° with a step width of 2° min⁻¹. The crystalline phases were identified by comparison with the files of the standards of Joint Committee Powder Diffraction Standards (JCPDS). The average size (D) of the crystallite of the samples was determined from the original data of XRD , applying the Debye-Scherrer equation (Eq.1):

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Eq. (1)}$$

In which k is the proportionality constant (depending on the geometry of the material), λ is the wavelength of X-rays, β is the opening (in radians) in half height of the peak more intense and characteristic of the crystalline phase of the material and θ is the diffraction angle. FTIR spectra were obtained with a spectrometer Agilent Technology, Cary 630. The surface morphology analysis and imaging were conducted using a Hitachi S4100i scanning electron microscope (SEM).

2.6 Selection and Biochemical properties of the BCL onto organometalics

Biochemical properties of immobilized biocatalysts BCL ZnO, with different protic ionic liquids (PILs) by covalent binding method of *Burkholderia cepacia* lipase in the hydrolysis reaction with pH 7.0, reaction temperature of 37° C and variation of loading enzyme/support (g/g) was 0.1; 0.2; 0.3 and 0.4g, were evaluated for checking the best relative activity. The thermal stability was determined at temperatures of 37 °C and 60°C in aqueous medium (0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) up to 240 min. As described in the literature, constant of thermal inactivation (k_d) and half-life ($t_{1/2}$) for the free lipase [22]. The operational stability of the immobilized biocatalysts was determined in hydrolysis reactions in regime of consecutive batches yet to achieve 50% of activity. Each immobilized biocatalysts stage was washed with hexane and reused.

3. Results and Discussion

3.1. Effect of loading enzyme/support

In Figure 1, it can be observed that among the immobilized biocatalysts the higher yield of immobilization was 166% obtained with loading 0.1 g/g using the modified support ZnO (BHEAA), yielding approximately 914.53 U/g of lipase activity. From the loading 0.2 to 0.4 g/g was observed a decrease in the yield of immobilization about 4.8 times in comparison of the maximum immobilization yield. The other immobilized biocatalysts in the presence of PIL, the loading of 0.3 g/g showed the best lipase activity with 817.78 U/g for ZnO (2HEAA) and 788.89 U / g for ZnO (2mHEAA). Already the immobilized ZnO in the absence of PIL presented a similar behavior to ZnO (2HEAA) and ZnO (2mHEAA) with lower initial activity in the loads of 0.1 and 0.2 g/g, and a significant increase with the load 0.3 g/g of 580.25 U/g. The load of 0.4g of enzyme/ support for all immobilized biocatalysts showed a decrease of the activity.

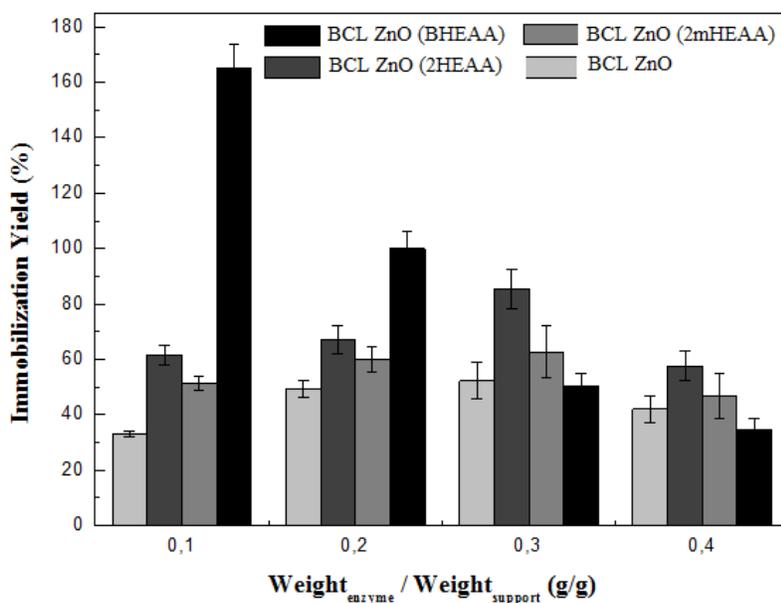


Fig. 1. Immobilization yield ranging the loading of the BCL in 0,1;0,2;0,3;0,4g

One of the possible causes of loss of activity with increasing of the enzyme/support relation can relate possibly with saturation of the available surface of the support causing

the inaccessibility of the substrate to the active site of the enzyme, possibly due to the formation of multilayer or even change the active site for immobilized BCL on ZnO (BHEAA) above 0.1 g/g and for the other biocatalysts in 0.4 g/g BCL ZnO, BCL ZnO (2HEAA) and BCL ZnO (2mHEAA) as described by different authors to other immobilized systems [23, 24].

According to HOU *et al.* [25], in their study of laccase immobilization on titania nanoparticles and titania functionalized membranes, the immobilized biocatalysts by covalent bonding that use glutaraldehyde as crosslinking agent and that present a low lipase activity is usually due to the reduction of the affinity between the active site of the enzyme and the substrate.

The BCL ZnO (BHEAA) presented a difference behavior in relation to other immobilized biocatalysts with maximum activity and higher yield of immobilization. It is assumed that due to the replacement of H by a grouping ethanol in PIL BHEAA, influencing in the increasing yield, because it is less chemically stable and easy interaction with the environment. Already the replacement of the grouping H by a methyl group, in the case of PIL 2mHEAA damaged the performance, due to its high chemical stability and difficult interaction. In the literature it is reported to protic ionic liquids, that the higher the carbon chain, the greater its positive influence on the immobilization yield [26, 27, 28, 29].

3.2. Selection of the Immobilized Biocatalyst

After determining the best loading for metal supports prepared in the presence of PIL, is described in Table 2, the immobilization yields of immobilized biocatalysts by covalent bonding. It can be observed that the best yields as well as the best lipolytic activities were presented for the immobilized biocatalysts in the presence of three types of PIL used, because their anionic portion did not vary due to have only been maintained acetate. And a cationic influenced positively the immobilization of BCL on support ZnO in the three types of PILs.

Table 2

Immobilization yield of the BCL in ZnO control and modified with PILs.

Biocatalyst	Enzyme added		Enzyme fixed			Humidity (%)	Immobilization yield (%)
	Enzyme Mass (g)	Enzyme activity (U)	Dry mass (g)	Activity (U/g)	Total activity (U)		
BCL ZnO	0.3	900	0.8091	580.25	469.48	7	52.16 +/- 6,5
BCL ZnO (2mHEAA)	0.3	900	0.7134	788.89	562.80	18	62.53 +/-9,432
BCL ZnO (2HEAA)	0.3	900	0.95	817.78	776.89	5	86.32 +/- ,9457
BCL ZnO (BHEAA)	0.1	300	0.546	914.53	499.33	9	166.44 +/- ,5436

According to GAO *et al.* [26], the interaction of the cations with the enzymes acts by Van der Waals force, playing a significant role in the interaction between the protein and the PIL. Increasing, thus, the enzyme stability with growing of the length of the alkyl chain of the cations. A higher or similar concentration of alkyl chains of cations can also be found at the interface of PILs, getting activity in aqueous solution and strongly affecting the stability and enzyme activity.

The support ZnO is hydrophobic [8] and the PIL BHEAA, which showed better results (BHEAA) in relation to the immobilization yield and lipase activity is hydrophilic, may have been interactions of ion exchange between the support and the ionic liquid possibly altering the characteristics of the hydrophilicity surface to hydrophobicity reversibly. The hydrophilic character of the PILs BHEAA and 2HEAA can easily be demonstrated by its ratio of ethanol-water partition coefficient (log P BHEAA is - 1.71 and log P 2HEAA is -1.61), indicating a greater hydrophilicity, since the log P > 0 has a higher hydrophobicity [12, 26]. As for the PIL (2mHEAA) which presented a lower immobilization yield from the biocatalysts tested, demonstrated that using PIL with log P (- 1.15) for being the least hydrophilic influenced negatively, possibly in the ion exchange between the support and the PIL.

3.3. Thermal and operational stability

Thermal stability of lipases is one of the most important criteria for enzymatic practical applications. After the selection of immobilized biocatalysts with higher immobilization yield and hydrolytic activity, it was evaluated the thermal stability of BCL free and BCL ZnO (BHEAA) and BCL ZnO (2HEAA) with load of 0.1g/g and 0.3g/g of enzyme-support, respectively.

As can be seen in Figure 2, the BCL ZnO (BHEAA) at temperature of 37°C showed better thermal stability in the beginning (until 120 h), when compared to the BCL ZnO (2HEAA). After 120h the behaviour is the same.

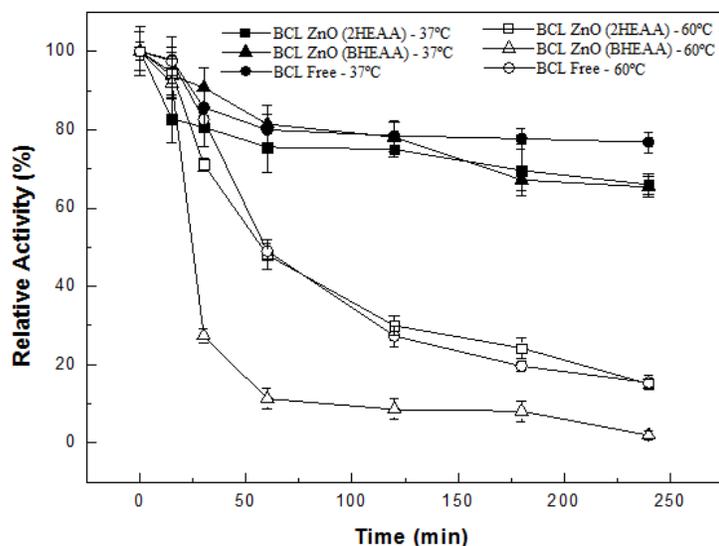


Fig. 2. Thermal Estability of the biocatalysts BCL ZnO (2HEAA), BCL ZnO (BHEAA), and free BCL in temperature of 37°C and 60°C.

Comparing the constant of thermal inactivation (k_d) of BCL ZnO (BHEAA) with the BCL ZnO (2HEAA) at a temperature of 37° C, it is observed that the values were approximate, 0.0026 h^{-1} and 0.0024 h^{-1} , respectively (Table 3). Providing a half-life ($t_{1/2}$) of 4.44 h to BCL ZnO (BHEAA) and 4.65 h with the BCL ZnO (2HEAA). However, both

half-life ($t_{1/2}$) and constant of thermal inactivation (k_d) for both immobilized biocatalysts showed a significant decrease in the temperature of 60° C.

Table 3

Thermal inactivation constant (k_d) and half-life ($t_{1/2}$) of the immobilized biocatalysts.

Immobilized Biocatalysts	Lipase	Temperature (°C)	K_d (h⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	References
BCL free	<i>Burkholderia cepacia</i>	37	0.00098	11	In this job
BCL free	<i>Burkholderia cepacia</i>	60	0.0101	1	In this job
BCL ZnO (BHEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	37	0.0026	4.44	In this job
BCL ZnO (BHEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	60	0.0747	0.15	In this job
BCL ZnO (2HEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	37	0.0024	4.65	In this job
BCL ZnO (2HEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	60	0.0091	1.2	In this job
Nb ₂ O ₅	<i>Burkholderia cepacia</i>	60	0.25	2.77	[30]
Cellulose	<i>Candida rugosa</i>	60	---	2.3	[19]
PHBV (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)	<i>Candida rugosa</i>	60	0.0334	2.1	[32]

At the temperature of 37°C, for both biocatalyst BCL ZnO (BHEAA) and the BCL ZnO (2HEAA) presented a relative activity of 100% in the time of initial reaction. With a lipase activity of 914.41 U/g and 817.3 U/g, respectively. Demonstrating that PIL BHEAA has a greater interaction with the support and the enzyme, due to replacement of H by the grouping ethanol, increasing both its yield as its reaction time. At the temperature of 60°C, the relative activity for both biocatalysts showed a 51% decay to BCL ZnO (BHEAA) in 30 min of reaction and 68% to BCL ZnO (2HEAA) in 120 min of reaction.

The variation of the relative activity of the biocatalysts compared to reuse cycles is demonstrated by Figure 3, in which it can be observed that the ZnO (2HEAA) and ZnO (BHEAA) after 4 reuses lost its relative activity more than 50% of the initial activity. Even BCL ZnO lost their activity after 3 reuses, showing that modification caused by ILs in their support structure offer a kind of protection to enzyme

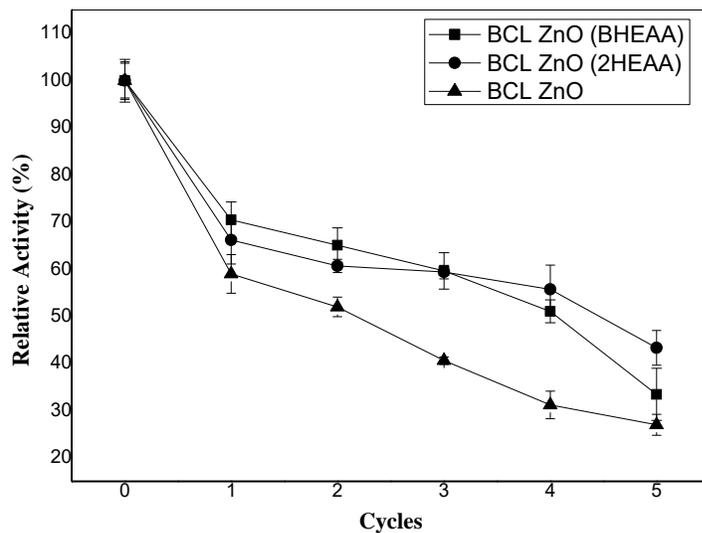


Fig.3. Relative activity of the immobilized biocatalysts BCL ZnO (2HEAA) and BCL ZnO (BHEAA) with load of 0.3g/g and 0.1 g/g of enzyme support, in function of the reuse and BCL ZnO.

3.4. DTA/TGA Characterization

In order to achieve a more detailed investigation of the thermal behavior of the samples based on support and biocatalyst, TGA curves were recorded for these samples. Temperature assigned to the DTA curves and the final weight loss values determined by TGA for ZnO control, BCL ZnO, BCL ZnO (2HEAA), BCL ZnO (2mHEAA) and BCL ZnO (BHEAA), are shown in Figure 4 a and b, that the biocatalysts that showed the greatest loss of mass were what had higher lipolytic activity, BCL ZnO (BHEAA) and BCL ZnO (2HEAA), with loss of mass 0.5% and 0.8% respectively, in the first stage (24 - 350°C).

The ZnO and ZnO (2mHEAA) demonstrated a loss of mass of 0.25% each. The ZnO control which showed a loss of 2.3%. The initial mass loss is associated with water evaporation from the surface of the biocatalyst and the decomposition of organic and amino groups, i.e., the enzyme present on the surface for pores of the support surface.

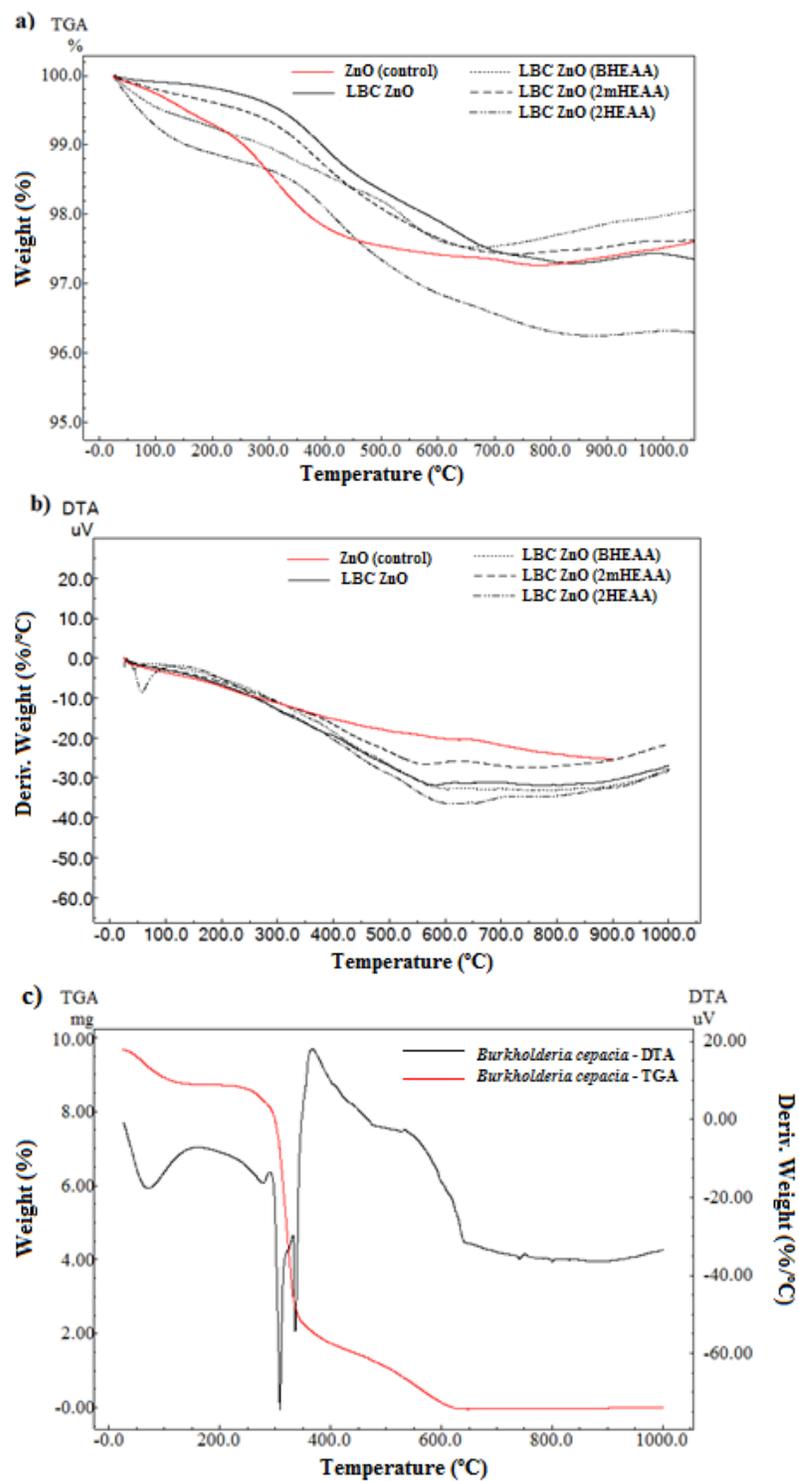


Fig. 4. Thermogravimetric analysis (a) DTA and (b) TGA of the ZnO (control), BCL ZnO, BCL ZnO (BHEAA), BCL ZnO (2HEAA) and BCL ZnO (2mHEAA) and (c) TGA/DTA of the free *Burkholderia cepacia* lipase.

At the second stage (Figure 4a and b) at a temperature of 350°C to 600°C, the mass loss was approximately 1% of immobilized biocatalysts and 0.3% for ZnO control, as described in the literature losses equivalent to the volatilization of some organic compounds and C, H, O and N from 600°C the mass loss was very low, about 0.2% due to complete carbonization of organic compounds, including lipase [32]. TGA/DTA results confirmed that immobilization reaction happened. Literature has been correlated a smaller mass loss of the immobilized substrates with the use of an additive providing the increased thermal stability of the support, resulting from the interaction between the precursor and the organic components (protic ionic liquid and lipase) [32].

According to Akçay *et al.* [33], in their study to observe the maximum temperature tolerance of the 1-n-butyl-3-methylimidazolium in metal oxides (SiO₂, TiO₂, γ -Al₂O₃, and MgO,) determined that the limits of thermal stability of ionic liquids (ILs) are different when they are coated with metal oxides, because it depends not only of their structural factors, but also other interactions with the environment, such as the interactions between ILs and metal oxides, resulting in significant changes in the limits of their stability. The determination of such structural factors controlling the limits of their thermal stability is crucial for the proper choice of ILs for immobilization in metal oxides.

3.5 X-Ray diffraction of the precursor ZnO

The structural knowledge of the prepared support is of great importance, since the data provide information associated to the crystalline structure and chemical status of the constituent elements, as well as the size of its crystals.

In Figure 5, it can be observed the diffraction of X-ray ZnO precursor dried at 105°C temperature. Analyzing the peaks it noticed a wide base and low intensity, meaning a sample with low crystallinity, contained OH, CO and water. Based on JCPDS standard record, the shaft $2\theta = 13.05^\circ$ is possible to observe the presence of a compound of (Zn(NO₃)₂ · 2Zn(OH)₂), possibly coming from the by-product of the preparation process. From the standard file JCPDS, the shaft $2\theta = 32.53^\circ$, the presence of ZnCO₃ was determined.

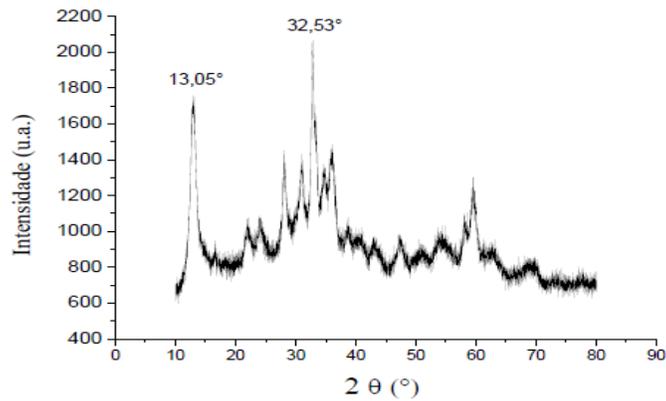


Fig. 5. Diffraction pattern of zinc oxide, dried at 105 °C

With calcination of zinc oxide at the temperature 350 °C, observed through the diffractogram, Figure 6, the profile of the diffraction X-rays, is according to the JCPDS, with characteristic peaks at $2\theta = 101$, 100, 002 and 110. Demonstrating the purity of prepared support, zinc oxide, and crystallinity, because of more strait the base of the peak and more intense is the peak more crystalline it is. According to the literature, the calcination process is made on the metal precursors to produce the oxides, which will be performed the processing of the samples by the release of carbonate and water present between the layers, into the atmosphere [34, 35].

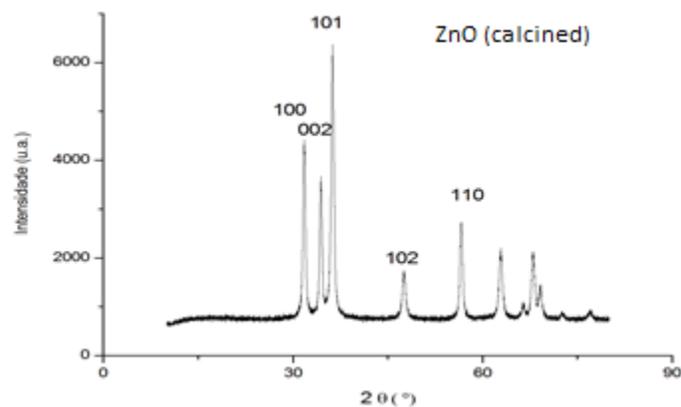


Fig. 6: XRD pattern of the calcined zinc oxide at 350 °C.

According to the literature, the study of the effect of the nanostructure on the urea sensing properties of sol-gel synthesized ZnO, in different concentrations dihydrate zinc acetate, observed the same profile of diffraction X-rays to ZnO, [35].

3.6 X - Ray diffraction of immobilized biocatalysts in the presence and absence of protic ionic liquid

Analyzing the diffractogram shown in Figure 7, it can be noted that ZnO (control) and modified with ionic liquid compared with zinc oxide in the form of powder calcined at 350°C showed characteristic peaks at $2\theta = 31,76$ (100), 34,42 (002), 36,29 (101), 47,56 (102) and 57,16 (110) based on standard record JCPDS, proving according to the literature, training ZnO, indicating that the structural layers of material are maintained and they do not suffered collapsed after chemical processes [23].

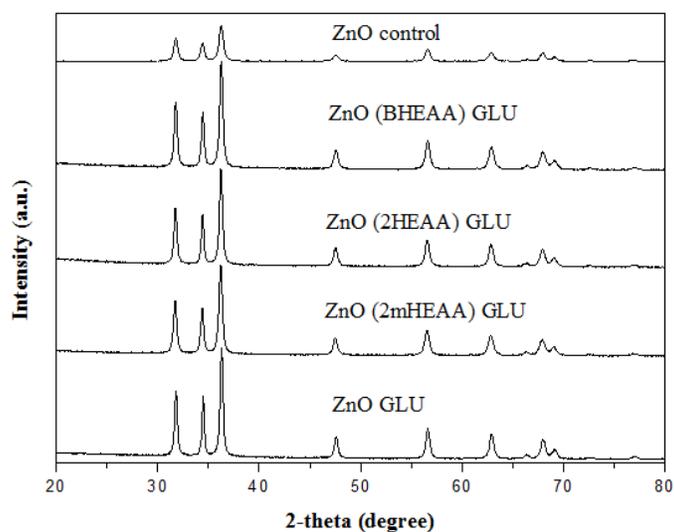


Fig. 7. Diffractograms of ZnO (control), ZnO GLU, ZnO (BHEAA) GLU, ZnO (2HEAA) and ZnO (2mHEAA) GLU.

This result was expected considering that the immobilization is on a considerable amorphous material, in the case *Burkholderia cepacia* lipase (BCL), therefore, their

structures have similar peaks, that are differentiated by the types of ionic liquids used, since they have not improved the form of biocatalysts but the crystallinity.

By observing the profiles of ZnO supports modified with protic ionic liquid, it is noted that their peaks are more crystalline than the control zinc oxide, the interplanar spacings are more uniform. The diffraction patterns that show more crystalline peaks among those with ionic liquid showed the best performance of immobilization, the ZnO (BHEAA) and ZnO (2HEAA), proving to be similar to those found in the literature [36]. However, because of the *Burkholderia cepacia* is an amorphous material, it has no crystalline peaks.

According to Scherrer's equation (Eq. 1) the diameters of particles of ZnO supports were calculated. Analysing Table 4, it can be seen that the particle diameter of the ZnO (control) diverged of the modified precursors with protic ionic liquids, as they were with 20.90 nm, 20.37 nm and 17,65 nm for ZnO (2HEAA) GLU, ZnO (BHEAA) GLU and ZnO (2mHEAA) GLU, respectively.

The best results with respect to the enzyme activity presented by immobilized biocatalysts were those that obtained the diameters of similar particles, that were ZnO (2HEAA) GLU with 20.9 nm and the ZnO (BHEAA) GLU with 20.37 nm. Similar results of the diameter of particle were found in the literature [23].

Table 4

Diameter of particles of samples.

Samples	Diameter of particles (nm)
ZnO control	16.21
ZnO GLU	23.9
ZnO (2mHEAA) GLU	17.65
ZnO (2HEAA) GLU	20.90
ZnO (BHEAA) GLU	20.37

The diameter of the supports in ZnO (control) and ZnO modified with protic ionic liquid can have diverged, due to the reaction with the reagents used in the methodology of

applied immobilization (Figure 8). According to the literature, the role of glutaraldehyde is to interact with the amino group of APTS, forming an imine bond and leaving the other aldehyde group to react with the amine residues of enzyme [37]. These interactions can lead to complete dissolution of the support, that were made due to defects in the surfaces of zinc grains or of oxygen that favor the fusion process, stimulating the coalescence of grains, as noted during the activation process with the glutaraldehyde (GLU) [24].

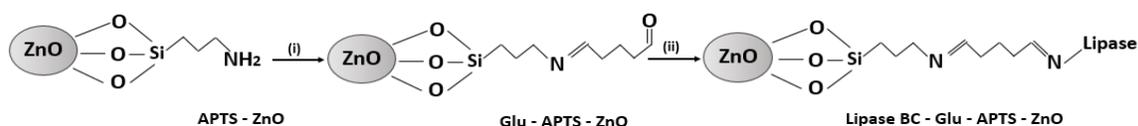


Fig. 8. Demonstration of the method of immobilization covalently bound (i) glutaraldehyde (ii) *Burkholderia cepacia* lipase.

Considering that the particles of the ZnO may redissolve dispersing the particles in larger sizes, modifying their size, during the process of immobilization. The ionic liquids can have maintained the aggregation of the particles that form the crystals of ZnO, leaving the values closer to ZnO control. This did not happen with the ZnO GLU in the absence of ionic liquid, that presented the diameter of particle of 23.9 nm.

3.7 Nitrogen adsorption-desorption

N₂ adsorption-desorption isotherms of ZnO control ZnO modified with PIL and immobilized support are reported in Fig. 9 and 10. As shown in Table 5, the modified ZnO with PILs and activated with glutaraldehyde (GLU) resulted in a decreased of a textural parameters like a surface area, pore volume and pore size than compared with the ZnO control.

These results might be indicated that the decrease of textural parameters was associated with the kind of functional group of PILs rather than the loading amount of PILs placed on support. The ionic liquid have different organic groups that can change yours extensibility, flexibility and spatial conformation, leading to effect on pore estructure

differently. This drop was consistent with the corresponding early research report [36, 38, 39]. May be the result a glutaraldehyde (GLU) chemical treatment. It seems that glutaraldehyde (GLU) treatment results in changes in the sample structure, and implicitly to a porosity decrease [40].

Table 4

Values of the surface area, pore volume and pore size of the ZnO control.

Sample	S_{BET} (m ² /g)	Pore Volume (cc/g)	Pore size (nm)
ZnO control	12.3	0.089	1.85
ZnO GLU	8.38	0.035	1.51
ZnO (BHEAA) GLU	6.23	0.025	1.88
ZnO (2HEAA) GLU	12.21	0.078	1.50
ZnO (2mHEAA) GLU	12.82	0.054	1.61
BCL ZnO	3.61	0.029	45.94
BCL ZnO (BHEAA)	4.24	0.043	20.62
BCL ZnO (2HEAA)	1.33	0.087	43.11
BCL ZnO (2mHEAA)	7.86	0.091	43.28

The isotherms of ZnO samples showed type III according to Singh [41]. Isotherms of this type are not common but there are a number of systems which give isotherms with gradual curvature (Figure 9). The shape and size of micropores influence in the hysteresis loop, like type H4. The narrow loops attribute to the large number of micropores [39].

The curves shows two distinct segments: the lower branch represents the volume of gas adsorbed by increasing the relative pressure (P / P_0), whereas the upper branch shows the volume of gas desorbed in the opposite case. The design of the curve has slight tilt to small increments relative pressure (P/P_0) to 0.35; suggesting the beginning of the adsorption of gas molecules on the catalyst surface where the monolayer formation occurs [42, 43].

In the intermediate range (P/P_0) between 0.35 to 0.9; it is checked significant increase in the amount of gas adsorbed, which suggests a strong interaction between the gas molecules and the surface of the catalyst, with early formation of multiple layers. From (P/P_0) 0.9 to maximum saturation pressure is checked large increase the amount of gas adsorbed, corresponding to the complete filling of the pores [42, 43].

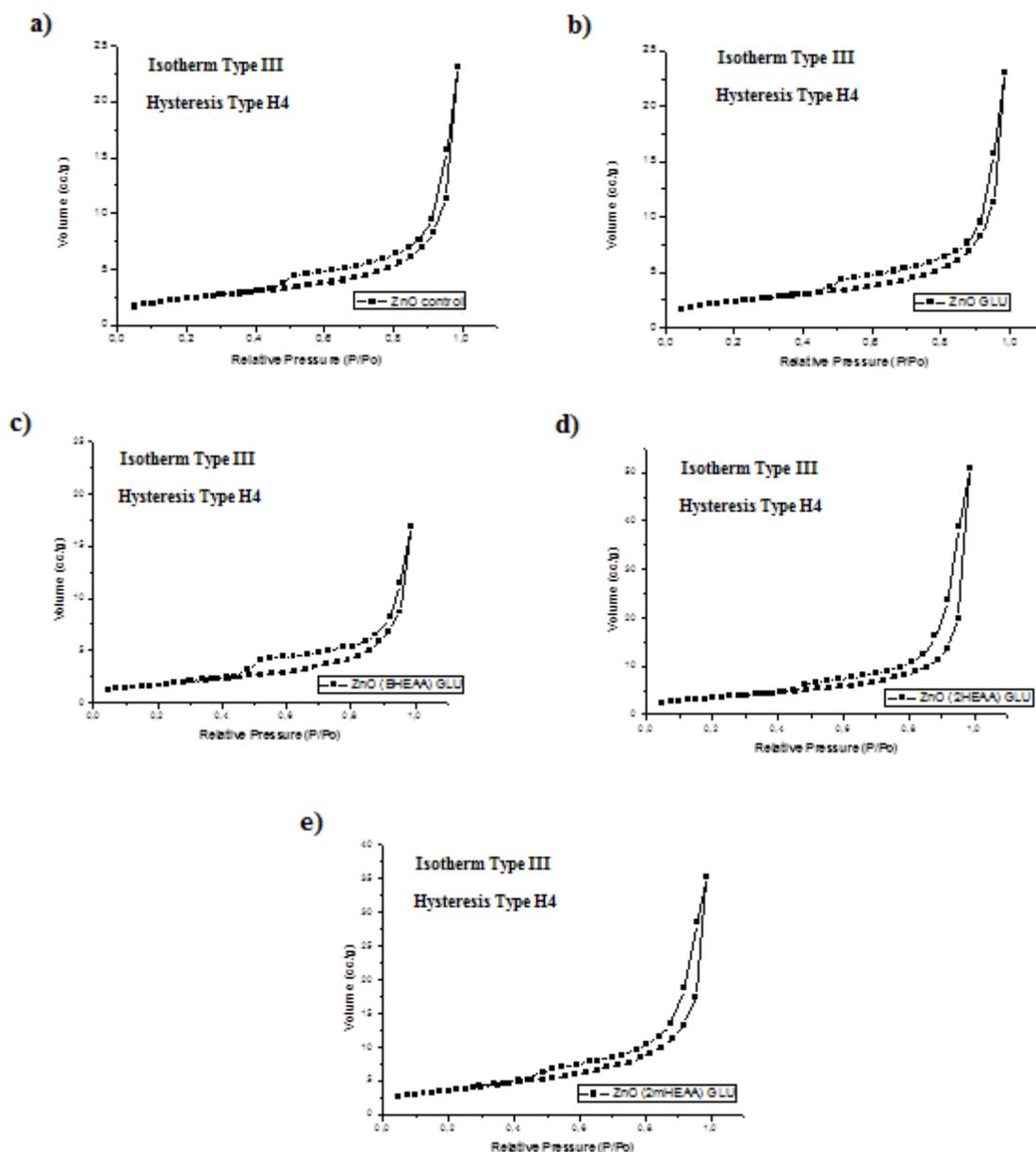


Fig. 9: Nitrogen adsorption-desorption isotherms of the zinc oxides supports: a) ZnO control, b) ZnO GLU, c) ZnO (BHEAA) GLU, d) ZnO (2HEAA) GLU and e) ZnO (2mHEAA) GLU.

As seen in Figure 10, the hysteresis loops became small and narrow after immobilization, mainly BCL ZnO (BHEAA) that presents the best immobilization yield (166%) and lipolytic activity results. Is observed aggregates giving rise to slit-shaped pores demonstrated hysteresis type H3. The presence of lipase produces a decreasing of the superficial area, because the fact and that the lipase diameter is 22.17nm (according to the

XRD results) is substantially larger than the supports pore size will prevent leaching of the enzyme but may lead to some pore blockage [37].

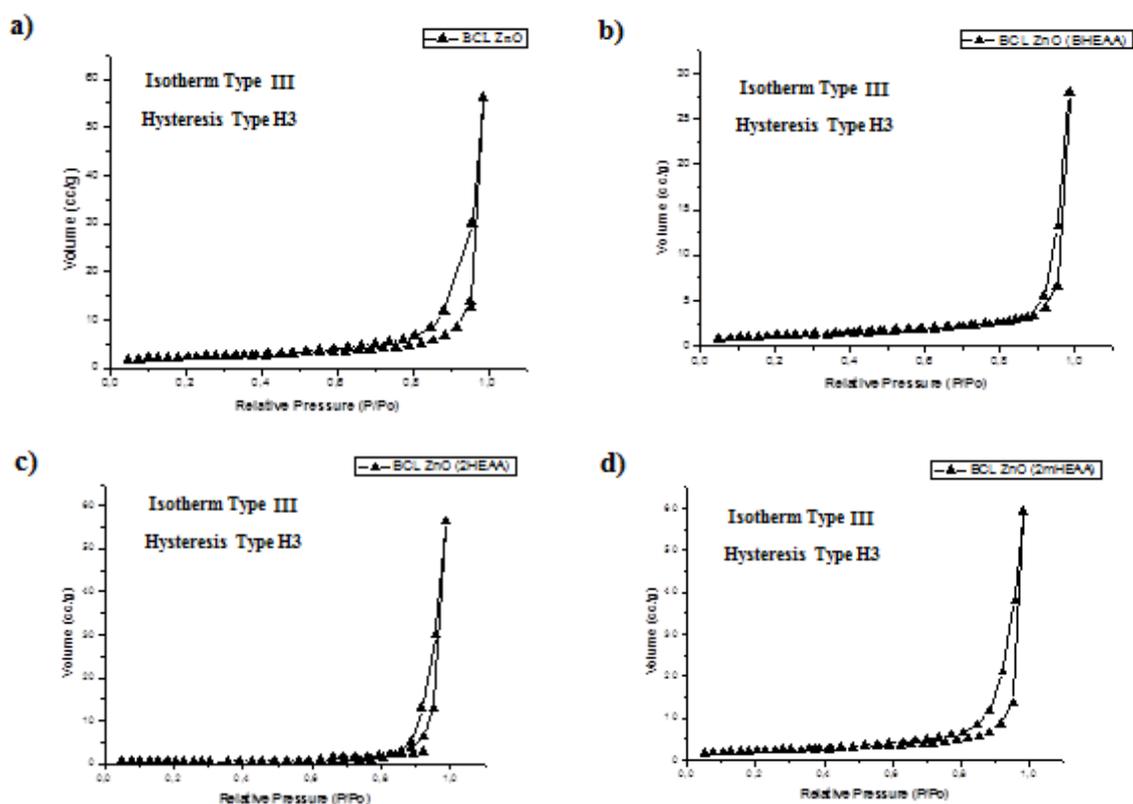


Fig. 10. Nitrogen adsorption-desorption isotherms of the zinc oxides biocatalysts: a) BCL ZnO, b) BCL ZnO (BHEAA), c) BCL ZnO (2HEAA) and d) BCL ZnO (2mHEAA).

3.8. FT-IR Measurements

Enzyme and glutaraldehyde (GLU) influence upon the chemical composition of supports was evaluated by FTIR. The FTIR transmittance spectra were recorded in the region of $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Spectra were recorded for the support before and after functionalization with GLU but also after BCL immobilization. Metal oxides generally give absorption in fingerprint region, below 1000 cm^{-1} arising from inter-atomic vibrations. The FTIR spectra of ZnO samples with and without GLU were shown in Figure 11. The transmittance peak assigned to samples the presence of broad bands ZnO characteristics indicating a certain organization at close range [44].

By analysing the spectral region between 2000 and 2250 cm^{-1} occurs a triple bonds stretching, related to the $C \equiv C$ or $C \equiv N$. According to Cavani *et al.* [45] and Nakamoto [46] the bands between 1380 a 1515 cm^{-1} are correlated with carbonate ions in hydrozincite $[\text{Zn}_5(\text{OH})_6(\text{CO}_3)_2]$. Already vibrations in frequencies lower than 1000 cm^{-1} are related mainly to inorganic groups, involving the Zn and are assigned to the stretching of the Zn-O bond, thereby demonstrating the presence of this. [47, 48]. One may notice in the spectrum of GLU samples the occurrence of the characteristic peak above 1000 cm^{-1} of ZnO. After GLU binding, this particular band disappears, indicating a quantitative OH functionality consumption as a result of surface activation with GLU at ZnO samples. Shows too a new band between 1500 and 1750 cm^{-1} , demonstrated that presents a modification of support structure, could be a carbonyl groups and aldehyde [49]. The same samples without GLU showed a band between 3500 e 3000 cm^{-1} related to the vibration of OH groups of the adsorbed water molecules [50].

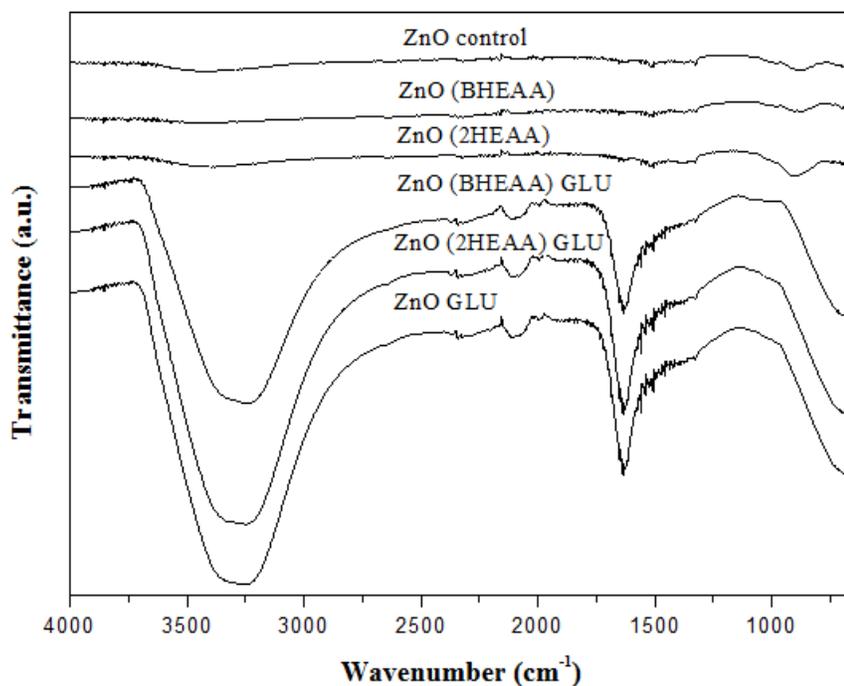


Fig. 11. FTIR spectra of the ZnO control, ZnO (BHEAA), ZnO (2HEAA), ZnO (BHEAA) GLU, ZnO (2HEAA) GLU and ZnO GLU

Figure 12, presents the FTIR spectra of BCL free, BCL ZnO (BHEAA) and BCL ZnO (2HEAA). After enzyme immobilization, a new peak appears at 1653 cm^{-1} . This peak occurs also in the spectrum corresponding to the pure enzyme, being assigned to Amide I group and was equivalent a C=O stretching vibration of the amide group coupled to the in-plane N–H bending and C–N stretching modes. Other peak appear between 1000 and 1250 cm^{-1} , correspondent to Amide III group represents 30% C–N stretching; 30% N–H bending; 10% C=O stretching; 10% O=C–N bending and 20% other [51].

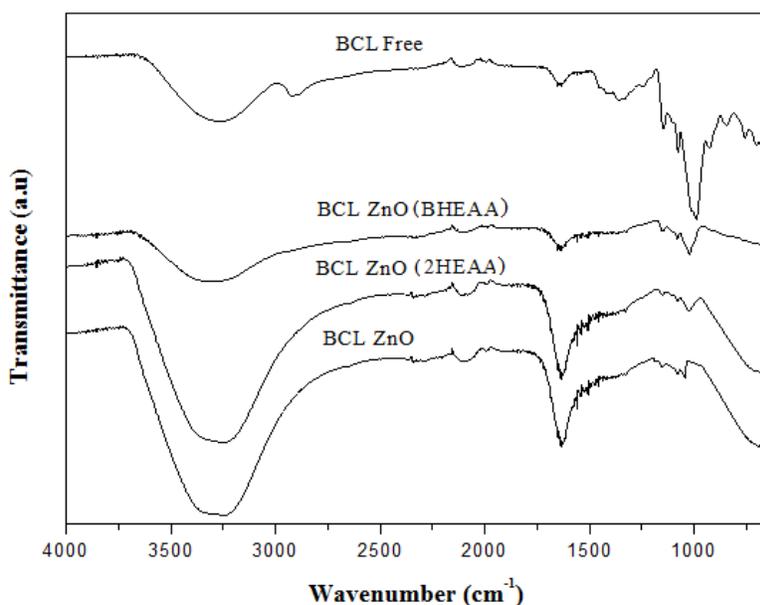


Fig. 12. FTIR spectra of the BCL free, BCL ZnO, BCL ZnO (BHEAA) and BCL ZnO (2HEAA)

Comparing the peaks from immobilized biocatalyst with free BCL, its possible to observe a decrease of the characteristic peaks at a wavelength between 1100 and 1200 cm^{-1} due to the setting free of lipase on the solid support. This probably occurs due to the interaction of glutaraldehyde with the amide groups of the enzyme, which will result in similar to the free enzyme bands [52, 36].

In order to support the FTIR results and to confirm the occurrence of functionalization and immobilization, the modifications produced by these reactions were further investigated by BET analysis.

3.9 Scanning electron microscope (SEM)

The micrographs obtained by SEM of the samples of ZnO (control) and ZnO GLU indicated that the surface of the precursor after the addition of glutaraldehyde (GLU) crosslinking agent, is more uniform when it is compared with the ZnO (control) in the absence of the reagent.

Figure 13a, presents the micrograph of the ZnO control is similar to study of semiconductors nanocomposites of ZnO/TiO₂ of SILVA *et al.* [18], in which it is observed that the particles are spherical and of larger size than ZnO GLU (Figure 13b). It can be observed that the activation with glutaraldehyde promoted increasing porosity and possibly of the surface area, allowing greater contact between the surface and the enzyme.

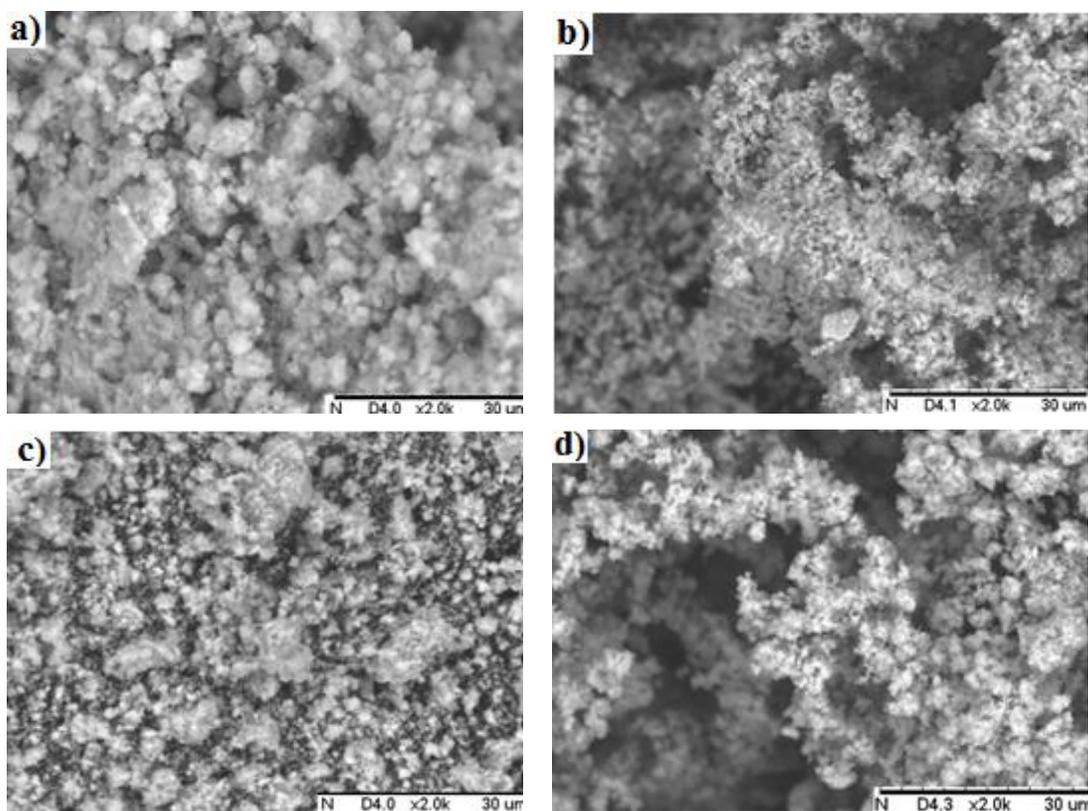


Fig.13. Micrographs of a) ZnO control, b) ZnO GLU, c) activated ZnO (BHEAA) GLU and d) BCL ZnO (BHEAA).

Analyzing the micrographs of the ZnO (BHEAA) in the presence of activated with glutaraldehyde (GLU), (Figure 13c) and of immobilized BCL ZnO (BHEAA) (Figure 13d), it can be observed that their distribution is more uniform and crystalline, demonstrating the existence of morphological similarity. However, the immobilized biocatalyst presents a structure with greater quantity of crystals, thereby showing the existence of immobilized enzyme in the support, this is confirmed by XRD, because the GLU influence.

4. Conclusion

The study of the use of modified metal supports with protic ionic liquid demonstrated that the use of the ionic liquid interposes in the support structure, increasing the interaction enzyme/support and consequently increasing the immobilization yield. It was observed that for BCL ZnO (BHEAA) was presented the best results of immobilization yield, 79% higher than the BCL ZnO (2HEAA). The thermal stability of both immobilized biocatalysts BCL ZnO (BHEAA) and BCL ZnO (2HEAA) presented the best results was in the 37 °C, in which the ZnO (BHEAA) presented a maximum relative activity of 100% in a reaction time of 120 min, already the ZnO (2HEAA) got in 60 min of reaction. Showing that PIL (BHEAA) has a greater interaction with the support and enzyme, due to replacement of H by ethanol group, increasing both its yield as its reaction time. Contrary to the PIL (2HEAA) that has a weaker interaction due to the substitution of H by methyl group, reducing immobilization yield and reaction time. Operational stability of both immobilized biocatalysts was four cycles of use.

In the physico-chemical and morphological characterization of the immobilized biocatalysts, it was observed that in the diffraction analysis of the DRX, the most crystalline peaks and that obtained similar diameter of particles were the modified supports with PILs that presented better immobilization yield and lipolytic activity, the ZnO (BHEAA) and the ZnO (2HEAA). In the analysis of the SEM, it was observed a more crystalline structure in the immobilized biocatalysts than in the support, thereby showing the presence of the immobilized enzyme, confirmed in the immobilization yield. The results of FTIR proved the occurrence of changes in the chemical composition as a consequence of

functionalization (GLU) and immobilizations reactions. Functionalization takes place at samples with GLU (OH groups are consumed in functionalization). The appearance of an enzyme characteristics peak in the spectrum reported the clearly evident contributions from primary and secondary amino groups are displayed in the immobilized samples, spectra confirmed the retaining of enzyme activity in the supporting materials.

5. Acknowledgments

The team appreciates the support received from the FAPITEC, CNPq, UNIT/ITP, BNB, REDE H₂ and ICP/CSIC. The present work was performed within the research program supported by the MICINN (Spain) under Project PIB2010Z-00531.

6. References

- [1] Prado, A. G. S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. *Química Nova*. 26 (2003) 738-744.
- [2] Gutmann, T.; Grunberg, A.; Rothermel, N.; Werner, M.; Srour, M.; Abdulhussain, S.; Tan, S.; Xu, Y.; Breitzke, H.; Buntkowsky, G. Solid-state NMR concepts for the investigation of supported transition metal catalysts and nanoparticles. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2013.
- [3] Miletic, N.; Vukovi, Z.; Nastasovi, A.; Looks, K. Macroporous poly (glycidylmethacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56 (2009) 196-201.
- [4] Gupta, S.; Bhattacharya, A.; Murthy, C.N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2 (2013) 171-190.
- [5] Ansari, S., Husain, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechn. Adv.* 30 (2012) 512-523.
- [6] Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, A., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigue, R. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synth Catalysis*. 353 (2011) 2885-2904.
- [1] Homaei, A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R. Enzyme immobilization: an update. *J Chemycal Biology*. (2013) 185-205.
- [7] Rahman, M. B. A.; Zaidan, U. H.; Basri, M.; Hussein, M. Z.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Salleh, A. B.. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugose* immobilised on Mg, Zn and NiO layered double hydroxides (LDHs). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 50 (2008) 33–39.
- [8] Talbert, J. N.; Goddard, J. M. Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 93 (2012) 8-19.
- [9] Shang, C., Li, W., Zhang, R. Immobilized *Candida antarctica* lipase B on ZnO nanowires/macroporous silica composites for catalyzing chiral resolution of (R,C) – 2 – octanol. *Enzyme Microbiology Technology*. 61 (2014) 28-34.
- [10] Hara, P., Mikkola, J.-P., Murzin, D., & Kanerva, L. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. 67 (2010) 129-134.

- [11] Zhao, D., Wu, M. Ionic Liquids: applications in catalysis. *Catalysis Today*. 74 (2002) 157-189.
- [12] Thakuria, H., Borah, B.M., Das, G. Macroporous metal oxides as na eficiente heterogeneous catalyst for various organic transformations—A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis A-Chemycal*. 274 (2007) 1–10.
- [13] Sekizawa, K., Widjaja, H., Maeda, S., Ozawa, Y., Eguchi, K. Low temperature oxidation of methane over Pd catalyst supported on metal oxides. *Catalysis Today*. 59 (2000) 69-74.
- [14] Al-Hazmi, F.; Alnowaiser, F.; Al-Ghamdi, A.A.; Al-Ghamdi, A.A; Aly, M.M.; Al-Tuwirqi, R.M.; El-Tantawy, F. A New Large – Scale synthesis of magnesium oxide nanowires: Structural and antibacterial properties. *Superlattices and Microstructures*. 52 (2012) 200-209.
- [15] Tsay, C-Y.; Lee, W-C. Effect of dopants on the structural, optical and electrical properties of sol-gel derived ZnO semiconductor thin films. *Current applied Physics*. 13 (2013) 60-65.
- [16] Malek, M.F.; Mamat, M.H.; Musa, M.Z.; Khusaimi, Z.; Sahdan, M.Z.; Suriani, A.B; Ishak, A.; Saurdi, I.; Rahman, S.A.; Rusop, M. Thermal annealing-induced formation of ZnO nanoparticles: Minimum strain and stress ameliorate preferred c-axis orientation and crystal-growth properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 610 (2014) 575-588.
- [17] Silva, S. S.; Magalhães, F.; Sansiviero, M. T. Nanocompósitos semicondutores ZnO/TiO₂: Testes fotocatódicos. *Química Nova*. 33 (2010) 85-89.
- [18] Park, S.; Kim, S.H.; Won, K.; Choi, J.W.; Kim, Y.H.; Kim, H.J.; Yang, Y.-H.; Lee, S.H. Wood mimetic hydrogel beads for enzyme immobilization. *Carbohydrate Polymers*. 115 (2015) 223-229.
- [19] Lee, S. H.; Lee, H. J.; Shiku, H.; Yao, T.; Matsue, T. A facile method for patterned growth of ZnO nanowires using a black ink. *Electronic materials letters*. 8 (2012) 511-513.
- [20] Chemical Spider. Log P. Disponível em: < <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13835336.html?rid=d114fb1b-9265-4723-ab8e-3e574d27b3ec>>. Acesso em: 17 mai 2015.
- [21] Soares, C.M.F.; Castro, H.F.; Moraes, F.F.; Zanin, G.M.. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemycal Biotechnology*. 79 (1999) 745-758.
- [22] 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*. 34 (2011) 831–840.

- [23] Elnashar, M. M. M. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 1 (2010) 61-77.
- [24] Hou, J.; Dong, G.; Ye, Y.; Chen, V. Laccase Immobilization on Titania Nanoparticles and Titania-functionalized Membranes. *Journal of Membrane Science*. 452 (2013) 229-240.
- [25] Gao, W.-W.; Zhang, F.-X.; Zhang, G.-X.; Zhou, C.-H. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis – Review. *Biochemical Engineering Journal*. 99 (2015) 67-84.
- [26] Sintra, T.E.; Cruz, R.; Ventura, S.P.M.; Coutinho, J.A.P. Phase diagrams of ionic liquid-based aqueous biphasic systems as a platform for extraction processes. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 77 (2014) 206-213.
- [27] Alvarez, V. H.; Mattedi, S.; Martin-Pastor, M.; Aznar, M.; Iglesias, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid phase equilibria*. 299 (2010) 42-50.
- [28] Naushad, M.; AlOtham, Z.A.; Khan, A.B.; Ali, M. Effect of ionic liquids on activity, stability, and structure of enzymes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51 (2012) 555-560.
- [29] Da Rós, P.C.M.; Silva, G.A.M.; Mendes, A.A.; Santos, J.C.; Castro, H.F. Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 101 (2010) 5508-5516.
- [30] Cabrera-Padilla, R. Y.; Melo, E. B.; Pereira, M. M.; Figueiredo, R. T.; Fricks, A. T.; Franceschi, E.; Lima, A. S.; Silva, D. P.; Soares, C. M. F. Use of ionic liquids as additives for the immobilization of lipase from *Bacillus sp.* *Journal of Chemical Technology*. 2014.
- [31] Souza, R.L., Faria, E.L.P., Figueiredo, R.T., Freitas, L.S., Iglesias, M., Mattedi, S., Zanin, G.M., Santos, O.A.A., Coutinho, J.A.P., Lima, A.S. Protic Ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, in Press. 52 (2013) 141-15.
- [32] Akçay, A.; Babucci, M.; Balci, V., Uzun, A. A model to predict maximum tolerable temperatures of metal-oxide-supported 1-n-butyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Chemical Engineering Science*. 123 (2015) 588-595.
- [33] Cardoso, L.C.; Moraes, M.C.; Cass, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*. 32 (2009) 175-187.
- [34] Ansari, S. G.; Wahab, R.; Ansari, Z. A.; Kim, Y -S.; Khang, G.; AL-Hajry, A.; Shin, H. - S. Effect of nanostructure on the urea sensing properties of sol-gel synthesized ZnO. *Sensors and Actuators*. 137 (2009) 566 – 573.

- [35] Hu, Y.; Tang, S.; Jiang, L.; Zou, B.; Yang, J.; Huan, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*. 47 (2012) 2291-2299.
- [36] Andrade, L.H.; Rebelo, L.P.; Netto, C.G.C.M.; Toma, H.E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by diferente methodologies on supermagnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 66 (2010) 55-62.
- [37] Zou, B.; Hu, Y.; Yu, D.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. *Biochemical Engineering Journal*. 53 (2010) 150–153.
- [38] Wang, F.; Zhang, Z.; Yang, J.; Wang, L.; Lin, Y.; Wei, Y. Immobilization of room temperatura ionic liquid (RTIL) on silica gel for adsorption removal of thiophenic sulfur compounds from fuel. *Fuel*. 107 (2013) 394-399.
- [39] Sandu, T.; Sarbu, A.; Damian, C.M.; Patroi, D.; Iordache, T.V.; Budinova, T.; Tsyntzarki, B.; Yardim, M.F.; Sirkecioglu, A. Functionalized bicomponent polymer membranes as supports for covalent immobilization of enzymes. *Reactive and Functional Polymers*. 96 (2015) 5-13.
- [40] Janaki, A.C.; Sailatha, E.; Gunasekaran, S. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 144 (2015) 17-22.
- [41] Sing, K.S.W.; Everett, D.H.; Haul; R.A.W.; Moscou, L.; Pierotti, R.A.; Rouquerol, J.; Siemieniowska, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure & Applied. Chemycal*. 57 (1985) 603-619.
- [42] Gregg, S. J., Sing, K. S. W. Adsorption, Surface Area and Porosity, 2nd ed. New York 1982.
- [43] Storck, S., Bretinger, H., Maier, W.F. Characterization of micro- and mesoporous solids by physisorption methods and pore – size analysis, *Applied Catalysis A: General*. 174 (1998) 137–146.
- [44] McMurry, J. Química Orgânica. São Paulo. 1, (2013) 398-407.
- [45] Cavani, F., Trifirò, F., Vaccari, A. Hydrotalcite – Type Anionic Clays: Preparation Properties and Applications. *Catalysis Today*. 11 (1991)173 – 302.
- [46] Nakamoto, K. Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 2^a ed, Wiley – Interscience. New York. (1970).

- [47] Mohajerani, M.S.; Mazloumi, M.; Lak, A.; Kajbafvala, A.; Zanganeh, S.; Sadrnezhad, S.K. Self-assembled zinc oxide nanostructures via a rapid microwave-assisted route. *Journal of Crystal Growth*. 310 (2008) 3621-3625.
- [48] Ebrahimiasl S, Zakaria A, Kassim A, Basri SN. Novel Conductive Polypyrrole/Zinc Oxide/Chitosan Bionanocomposite: Synthesis, Characterization, Antioxidant, And Antibacterial Activities. *International Journal of Nanomedicine*. 10 (2014) 217-227.
- [49] Kajbafvala, A.; Shayegh, M.R.; Mazloumi, M.; Zanganeh, S.; Lak, A.; Mohajerani, M.S.; Sadrnezhad, S.K. Nanostructures sword-like ZnO wires: Rapid synthesis and characterization through a microwave-assisted route. *Journal of Alloys and Compounds*. 469 (2009) 293-297.
- [51] Stuart, B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. *Analytical Techniques in the Sciences*. (2004).
- [52] Pirozzi, D.; Fanelli, E.; Aronne, A.; Pernice, P.; Mingione, A. Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol-gel synthesis and catalytic properties. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*. 50 (2009) 116-120.

ARTIGO 2

Improved enzymatic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized in Al₂O₃ modified with protic ionic liquids

I.C. Feitosa¹, L.M.S. Brandão¹, M.S. Santos¹, L.R. Prado¹, R.M. Santos³, L.S. Freitas³, Á.S. Lima^{1,2}, R.T.Figueiredo^{1,2}, C.M.F. Soares^{1,2} *.

¹*Universidade Tiradentes-UNIT, Aracaju SE, 49030-270 Brazil;* ²*Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, Aracaju SE, 49030 -270 Brazil; phone/ fax: 55 79 3218 2190; e-mail: cleide.soares@pq.cnpq.br,* ³*Universidade Federal de Sergipe-UFS.*

* To whom correspondence should be addressed:

Tel: +55 7932182190 e-mail address: cleide.soares@pq.cnpq.br

Abstract

Al₂O₃ modified with protic ionic liquid (methyl-monoethanolamine acetate - 2mHEAA; monoethanolamine acetate - 2HEAA and diethanolamine acetate - BHEAA) were used for immobilization from *Burkholderia cepacia* lipase (BCL). The immobilized lipase modified with methyl monoethanolamine acetate, BCL Al₂O₃ (2mHEAA), that present the best immobilization yield (204.43%) obtained with a loading of 0.1g/g and lipolytic activity 740.98 U/g. The reusability of BCL Al₂O₃ (2mHEAA) demonstrated the best operational stability, twice time that BCL Al₂O₃ control. BCL immobilized in support modified with protic ionic liquids (PILs) have more thermal stability than the control support (not modified). Modification of the support surface by protic ionic liquids confirmed by DRX and MEV analyzing the decrease of the diameter of particles and rugosous surface. The pore size, pore volume and superficial area been modified for the ionic liquids too, demonstrated by BET. The immobilization was confirmed by FTIR.

Keywords: lipase, protic ionic liquid, Al₂O₃, immobilization.

1. Introduction

The application of lipase has been deterred by the high cost of enzymes, contamination of products with residual protein and the difficulties of recovery and recycle thermal stabilities. However many attempts have been made over the years to overcome these shortcomings, including genetic engineering, protein engineering, fermentation engineering, chemical modification, purification process and enzyme immobilization [1]. The immobilization of lipase have been studied by physical adsorption, entrapment, covalent coupling and cross-linking on a variety of supports [2].

The factors which influence the amount of enzyme attached to the solid support and the activity of enzyme retained is rather limited. A knowledge of these factors is important for the usage of lipase as the biocatalyst for industrial and clinical utilization. The bond of lipase on the solid surface, porous glass, cellulose, nylon, silica gel and alumina depends on such factors as pH, ionic strength, isoelectric point of enzyme, surface and enzyme properties [3].

The covalent immobilization, which involves unipontual or multipoint covalent attachment of an enzyme to a carrier either directly or through a spacer, has the advantage of preventing enzyme leaching. Is the orientation of a protein via a particular amino acid on the other hand, allows proteins to be arranged in a more controlled style. In general, functional properties of an immobilized enzyme (activity toward different substrates, selectivity, stability) depend on the way that the protein is immobilized on support [4]. The kind of immobilization of lipase has been carried out on different supports including both hydrophobic and hydrophilic materials [5].

The choice of appropriate support as well as method of immobilization is essential to make industrially important biocatalyst. A large number of synthetic or natural supports with different shapes/sizes, porous/non-porous structures, different aquaphilicities and binding capacity have been used for lipase immobilization. Among these supports that have been studied are inorganic materials like: silica, celite, ceramics, metal oxides, porous glass, sepharose, sephadex, cellulose, zeolites, polyethylene, and others. Most of these materials are commercially available and much information is known about their operational characteristics [6, 7].

Inorganic materials which are made mostly of metal oxides, are usually nontoxic, inert, low cost, chemically, mechanically and thermally stable, so they have wide applications where biocompatibility and thermal stability requirements are essential [8]. Alumina in particular enjoys broad applicability as a catalyst support, heat-resistant material, resistance to organic solvents, uniformity of pore size, high pore density and low cost. The hydrolysis behavior of alumina is very complicated and strongly affected by acid, water, temperature, relative humidity and other factors, giving rise to rather strict synthetic conditions for alumina [9].

Some kinds of solvents are used for modified the surface of support, as ionic liquids, PEG and Triton X. The use of pure ionic liquids or mixed with organic solvents are widely recommended for modified support for immobilization offering the possibility to combine advantages such as the immobilization of metal supports with ionic liquids [1, 10, 11].

In this study different protic ionic liquids (PILs) as diethanolamine acetate (BHEAA), monoethanolamine acetate (2HEAA) and methyl monoethanolamine acetate (2mHEAA) was grafted onto the Al_2O_3 for modifying the surface and was used to immobilized *Burkholderia cepacia* lipase.

2. Experimental

2.1 Materials

The organometallic support Al_2O_3 was produced using the precursor sodium carbonate and zinc nitrate were purchased either from Vetec Quimica Fina *Ltda*. The silane precursor 3-Aminopropyltriethoxysilane (γ -APTS) and activate predursor Glutaraldehyde were purchased from Sigma-Aldrich. Microbial lipase of *Burkholderia cepacia* (LBC) was purchased from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA).

2.2 Preparation of the support

To form the precursor from aluminum oxide was synthesized by NH_3OH and $\text{Al}_2(\text{NO}_3)_3$ in a water bath at a temperature of 60 °C, under mechanical stirring, in the presence of these protic ionic liquids (PILs): Methyl-Monoethanolamine Acetate (2mHEAA);

Monoethanolamine Acetate (2HEAA) and Diethanolamine Acetate (BHEAA) - Al₂O₃ (2mHEAA), Al₂O₃ (2HEAA) and Al₂O₃ (BHEAA), respectively. For obtain the Aluminum Oxide, its necessary calcinate the material for 7 hours at a temperature of 350 °C for to obtained the supports: Al₂O₃ control, Al₂O₃ (2mHEAA), Al₂O₃ (2HEAA) and Al₂O₃ (BHEAA).

2.3 Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) in Al₂O₃ support

Aluminum oxide were employed as support for immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) through covalent binding. After the support silanization with γ -APTS 0.5% (v / v), the supports were activated by dipping in glutaraldehyde (GLU) for 10 minutes at room temperature. The support was washed with deionized water at each step to remove the excess of glutaraldehyde. The coupling of enzyme in the support was allowed to occur with a variation of its loading for each immobilization (0.1, 0.2, 0.3 and 0.4g enzyme/g support) under mild agitation for a period of 3 h for BCL immobilized in control support (BCL Al₂O₃) and immobilized biocatalyst in modified support BCL Al₂O₃ (2mHEAA), BCL Al₂O₃ (2HEAA) and BCL Al₂O₃ (BHEAA).

The activity of immobilized lipase was determined by Soares [12] method when considered one unit of activity was defined as the amount of enzyme which liberates 1 μ mol of fatty acid per min of reaction under the conditions of the assay. The activities were expressed as μ mol/g.min.

$$\text{Lipolytic Activity (U / g)} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times m} \quad \text{Eq. (1)}$$

Where: V_a = volume of sample titrated (mL); V_b = volume white titration (mL); M = molarity of KOH solution (mol.L⁻¹); t = reaction time (min); m = mass of the sample used in the reaction (g).

2.4 Characterization of fixed brackets

Thermal Gravimetric Analyses (TGA) and Differential Thermal Gravimetry (DTG) were obtained simultaneously on an Apparatus, on Shimadzu. The TGA/DTG curves recorded in N₂ from room temperature up to 900 °C at a heating rate of 10 °C/min for support control, BCL free, support modified: Al₂O₃ (2mHEAA), Al₂O₃ (2HEAA) and Al₂O₃ (BHEAA) and immobilized biocatalysts: BCL Al₂O₃ (2mHEAA), BCL Al₂O₃ (2HEAA) and BCL Al₂O₃ (BHEAA). In others analysis were used for the same samples. Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained with a Hitachi S4100i. Fourier transformation infrared spectrum (FTIR) was performed on Agilent Technology, Cary 630. The N₂ adsorption-desorption isotherms at -196°C were elaborated by the Brunauer-Emmet-Teller (BET) method for the calculation of the surface areas and were obtained by Quanta Chrome Multistation Instruments, Autosorb 3B with a vacuum system (10-3Torr). The X-ray diffraction (XRD) from the support control and modified support were obtained using a Shimadzu, XRD-6000, apparatus with CuK α ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$), radiation at 40kV e 30 mA in a range of 10 - 80° with a step width of 2° min⁻¹.

2.5 Activity Assay of immobilized biocatalysts

The activity of the immobilized biocatalysts was assayed by hydrolysis reaction with pH 7.0, reaction temperature of 37° C, using a thermostatic shaker, and variation of loading enzyme/support (g/g) was 0.1; 0.2; 0.3 and 0.4 w, were evaluated for checking the best relative activity. The effect of temperature was conducted by incubating the immobilized biocatalysts at temperatures of 37 °C and 60°C in aqueous medium (0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) up to 240 min and the half-life time was calculated by $t_{1/2} = \ln 0,5 / (-K_d)$. Reusability of the immobilized biocatalysts was evaluated in hydrolysis reactions in regime of consecutive batches with reuse of the immobilized system.

3. Results and Discussion

3.1. Catalytic Activity

The immobilization efficiency and activity of the resulting immobilized lipase of different charges were given in Figure 1. The effect of varying enzyme / support (w/w) shows a significant increase in relative activity between 0.1 and 0.3 $w_{\text{enzyme}} / w_{\text{support}}$ for the biocatalysts BCL Al₂O₃, BCL Al₂O₃ (2HEAA) and BCL Al₂O₃ (BHEAA) showing similarity in activity increased with increasing load change, as reported previously in studies in the literature for *Bacillus sp* lipase immobilized on poly 3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate – PHBV, in the presence of different aprotic ionic liquids: 1-butyl-3-metilpiridinium chloride [C₄mpy] Cl; f 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [C₄min] Cl; 1-butyl-3-methylimidazolium dicyanamide [C₄min] C (CN)₂; 1-butyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide [C₄min] Tf₂N; 1-ethyl-3-methylimidazolium bis carbodiimide (trifluoromethylsulfonyl) [C₂min] Tf₂N [13].

BCL Al₂O₃ (2mHEAA) shows the best immobilization yield with 204.43% (loading of 0.1g/g) and lipolytic activity 740.98 U/g. For the same immobilized biocatalyst there is a decrease of lipolytic activity and immobilization yield when the reduction of the loading amount occurs (0.2–0.4 $g_{\text{enzyme}} / g_{\text{support}}$). For the others immobilized biocatalyst, the maximum immobilization yield and lipolytic activity was observed with a loading of 0.3 g/g, for BCL Al₂O₃ (BHEAA) the immobilization yield was 67.8% and 603.06 U/g of lipolytic activity. The BCL Al₂O₃ (2HEAA) presents a 451.76 U/g and 50.2%, the BCL Al₂O₃ produced a 514.11 U/g and 44.73% for immobilization yield and lipolytic activity, respectively.

The best results from BCL Al₂O₃ (2mHEAA) can be explained by the high umidity (11%) present in immobilized biocatalyst. According to the literature a certain amount of water is necessary for enzyme conformation and to maintain flexibility during catalysis. Solvent with low log P values, like 2mHEAA (log P = - 1,15), may strip the water of the enzyme molecules, thereby rendering them inactive [14]. Because of the high humidity probably doesn't succeeded.

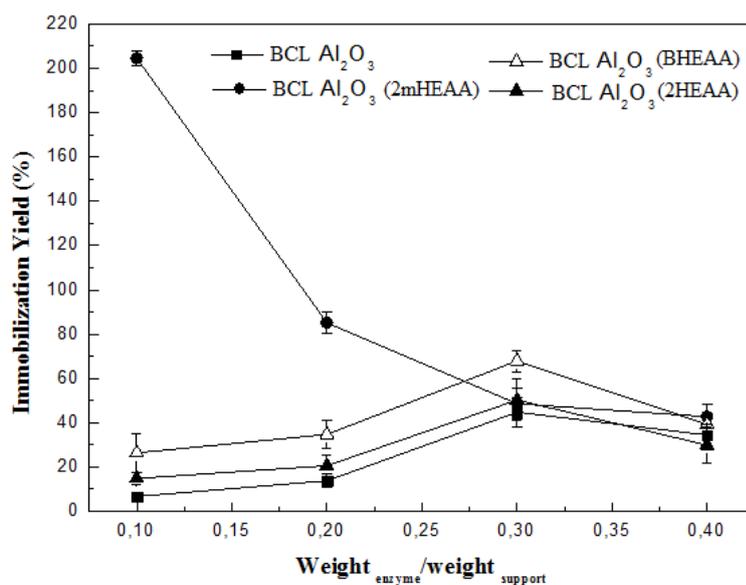


Fig. 1. Immobilization yield ranging the loading of the BCL from 0.1 to 0.4 $\text{weight}_{\text{enzyme}}/\text{weight}_{\text{support}}$.

In loading for 0.4 (w/w) for all the immobilized biocatalyst happen a decrease in efficiency, may be related to the aggregation of enzyme at higher enzyme/support ratio to hind some active sites [15]. Therefore, the efficiency decreased sharply when the ratio of enzyme/support was higher than 0.3 w/w.

The effect of varying enzyme/support (w/w) was tested and the best results was BCL Al₂O₃, BCL Al₂O₃ (BHEAA), BCL Al₂O₃ (2HEAA) in a loading for 0.3 $\text{w}_{\text{enzyme}}/\text{w}_{\text{support}}$ and BCL Al₂O₃ (2mHEAA) in a loading for 0.1 $\text{w}_{\text{enzyme}}/\text{w}_{\text{support}}$ (Table 1).

Table 1

Immobilization yield of the BCL in Al₂O₃ and Al₂O₃ modified with PILs.

Biocatalyst	Enzyme added		Enzyme fixed			Humidity (%)	Immobilization yield (%)
	Enzyme mass (g)	Enzyme activity (U)	Dry mass (g)	Activity (U/g)	Total activity (U)		
BCL Al ₂ O ₃	0.3	900	0.7830	514.90	402.55	10	44.73 +/- 6.5
BCL Al ₂ O ₃ (2mHEAA)	0.1	300	0.8277	740.98	613.31	11	204.44 +/- 3.5
BCL Al ₂ O ₃ (2HEAA)	0.3	900	1.0000	451.76	451.76	5	50.90 +/- 9.4
BCL Al ₂ O ₃ (BHEAA)	0.3	900	1.0120	603.06	610.30	8	67.81 +/- 4.

According to the literature [16, 17, 18], the hydrophilic/hydrophobic character of the PILs can be demonstrated by ratio of ethanol-water partition coefficient ($\log P$), since the $\log P > 0$ has a higher hydrophobicity. The $\log P$ from PIL 2mHEAA is -1.15, the $\log P$ from BHEAA is -1.71 and from 2HEAA is -1.61. The affinity of a lipase for an adsorbent generally increases with the hydrophobicity of the surface. The hydrophilic/hydrophobic balance of the support material is a very important factor since the support materials affects the water content in the microenvironment of the enzymes and the portioning of substrates and/or products in the reaction mixture [3]. The PIL 2mHEAA presented the best immobilization yield and lipolytic activity probably to be less hydrophilic and the PIL interact better with Al_2O_3 .

Moreno and Sinisterra [19], have described the properties of *Candida cylindracea* lipase covalently bound to the inorganic solid support. They stated that lipase immobilized on silica and alumina exhibited great activity and stability because the substrate on the mesoporous supports can easily reach the active site of the enzyme. Kumar et al. [5], study the covalent immobilization of *Bacillus sp.* on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction and showed mechanical tough, resistant to high pH and temperature and presented a immobilization yield of 78,2% and yet is important described in the literature there are not studies with Al_2O_3 modified with PILs evaluate in this work.

3.3. Effect of temperature and recyclability of immobilized biocatalyst

The resistance of immobilized lipase to temperature at certain time is an important potential advantage for practical applications of this enzyme [20]. Improvement in the thermal stability of immobilized enzymes typically reflects the interaction between the lipase and support collaborating in preventing conformational transitions of the enzyme at high temperatures [21]. The effect of temperature was carried out with free BCL and immobilized BCL on the Al_2O_3 (2mHEAA) and Al_2O_3 (BHEAA), that presents the best immobilization yield and lipolytic activity, varying temperature from 37 and 60 °C. As can be seen in Figure 2, the BCL Al_2O_3 (2mHEAA) at temperature of 37°C showed better thermal stability when compared to the immobilized biocatalyst BCL Al_2O_3 (BHEAA).

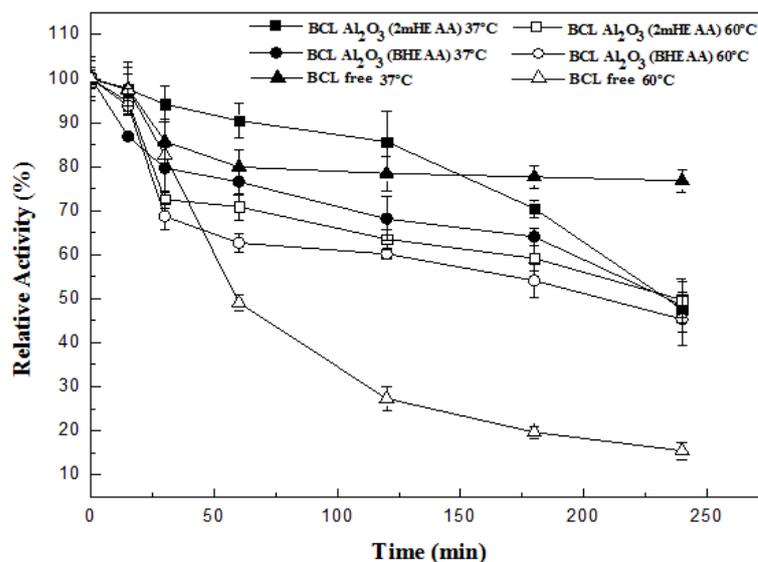


Fig. 2. Effect of temperature of the biocatalysts BCL Al₂O₃ (2mHEAA), BCL Al₂O₃ (BHEAA) and free BCL in temperature of 37°C and 60°C.

According to Salehi *et al.* [22], the thermal stability of lipases depends on their structures and in a process at a high temperature because of unfolding and heat-induced destruction of non-covalent interaction in enzymes, many problems can be encountered. One of the reasons for enzyme immobilization is the increase in its stability toward various deactivating forces, due to the enzyme restricted conformational mobility following the immobilization [23]. The formation of intermolecular covalent bonds between the enzyme molecules and matrix support confer rigidity on the structure of the enzyme molecule, so that the enzyme is less affected by denaturing effect of temperature [24].

The thermal stability of the lipase was measured in terms of half-life ($t_{1/2}$). The half-life of the enzyme was determined from the steady thermal denaturation (Table 2). It was found that the increase in temperature causes a decrease in thermal stability of lipases, as seen in Table 3, in temperature of 60 °C for both biocatalysts. The half life time was 4.27 h for BCL Al₂O₃ (2mHEAA) and 3.53h for BCL Al₂O₃ (BHEAA). In low temperatures, 37°C, the half life time increased, for BCL Al₂O₃ (2mHEAA) was 7.22 h and for BCL Al₂O₃ (BHEAA) was 3.53 h. In this sense, the smaller the constant denaturation was greater half life of the enzyme and consequently was more stable in temperature analysis. The support Al₂O₃, presents a high thermal stability [25].

Table 2

Thermal inactivation constant (K_d) and half-life ($t_{1/2}$) of the Al_2O_3 immobilized biocatalysts obtained with temperatures of 37° e 60°C.

Immobilized Biocatalysts	Lipase	Temperature (°C)	k_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
BCL free	<i>Burkholderia cepacia</i>	37	0.00098	11
BCL free	<i>Burkholderia cepacia</i>	60	0.0101	1
BCL Al_2O_3 (2mHEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	37	0.0016	7.22
BCL Al_2O_3 (2mHEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	60	0.0027	4.27
BCL Al_2O_3 (BHEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	37	0.0021	5.3
BCL Al_2O_3 (BHEAA)	<i>Burkholderia cepacia</i>	60	0.0032	3.53

The investigation of reusability of the immobilized lipase in the hydrolysis reaction for 5 cycles revealed a gradual decrease in efficiency after 1 cycle in all biocatalysts. Figure 3, the BCL Al_2O_3 (2mHEAA) demonstrated that best operational stability was 4 cycles, BCL Al_2O_3 (BHEAA) was 3 cycles and BCL Al_2O_3 was 2 cycles. The BCL Al_2O_3 (2mHEAA) presented the best result of lipase activity and immobilization yield besides the operational stability.

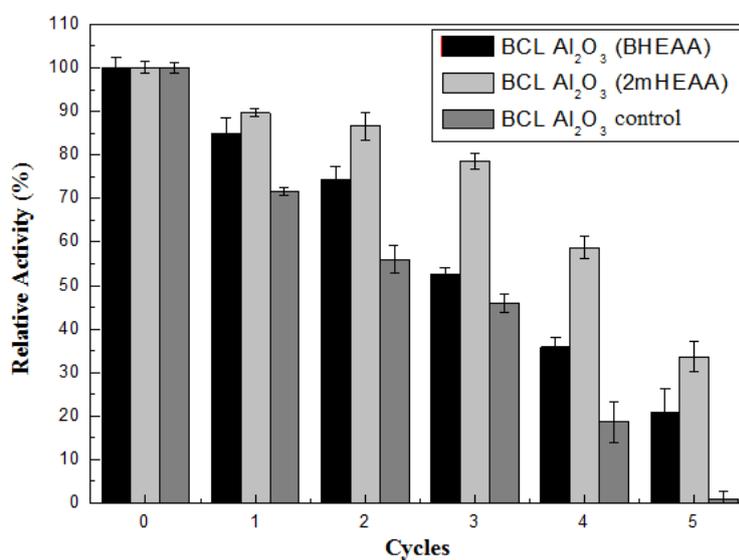


Fig. 3. Relative activity of the immobilized biocatalysts BCL Al_2O_3 (2mHEAA), BCL Al_2O_3 (BHEAA) and BCL Al_2O_3 control, in function of the cycle number of reuse.

Nagar *et al.* [26], reported the immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. They obtained 10 consecutive cycles retaining 60-65% of its initial activity for operational stability due to the mechanical resistance of these pellets.

Which could be due to several reasons including the inhibitory effect of water released during hydrolysis, a combined effect of deactivation/desorption of lipase and repeated manipulation operations [5]. According to Vaidya *et al* [27], recyclability of the immobilized lipase depends either on nature of the support or the enzyme source. The covalent binding technique generally gives better stability against leaching. Thus it can be used for long period of with standing repeated filtering/washing process. However, fixed enzymes on the solid surface may severely alter the enzyme conformation and decrease the enzyme activity [28].

3.4. DTA/TGA Characterization

According to Figure 4a, the first step was observed from room temperature to around 135° C is interpreted as dehydration and the decomposition of organic and amino groups, the enzyme present on the surface for pores of the support surface [29]. The mass loss from BCL Al₂O₃ (2mHEAA) was the most higher (42%) than the others demonstrated, BCL Al₂O₃ was 20%, BCL Al₂O₃ (BHEAA) was 5% and BCL Al₂O₃ (2HEAA) was 35%.

In the second stage (Figure 4b) can observe an exothermic peak in DTA curve in all the immobilized biocatalysts at a temperature of 290 °C to 400 °C, the mass loss was approximately 7%, that might be a complete volatilization of the interstitial water or could be CO₂ release. In the temperature of 400 and 500°C show an endothermic peak, that the mass lost (≈ 4%) could be the volatilization of some organic compounds and C, H, O and N [30]. The Al₂O₃ which offers a larger surface area and improves the thermal effect.

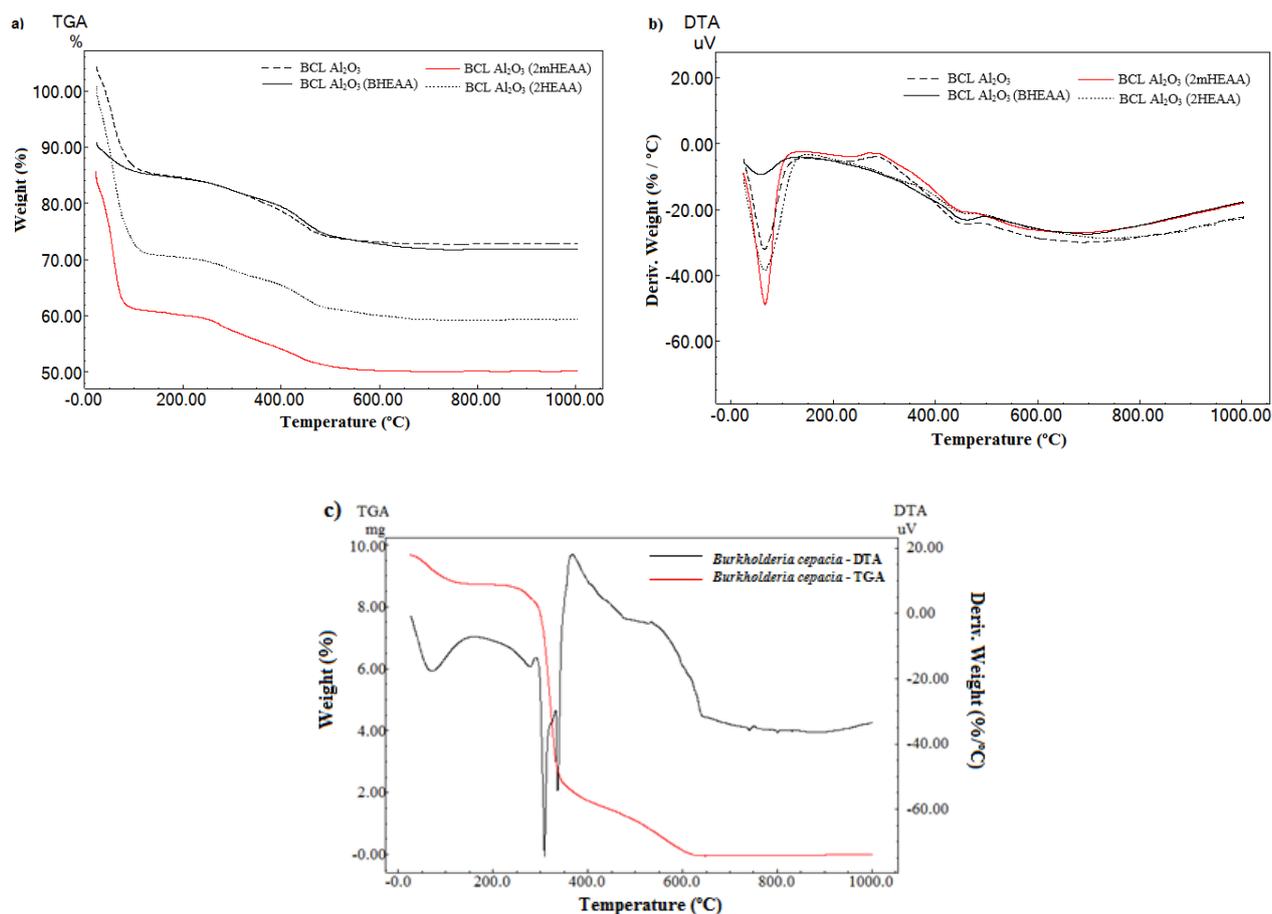


Fig. 4. Thermogravimetric analysis a) TGA of the BCL Al₂O₃, BCL Al₂O₃ (2mHEAA), BCL Al₂O₃ (BHEAA) and BCL Al₂O₃ (2HEAA), b) -DTA of the BCL Al₂O₃, BCL Al₂O₃ (2mHEAA), BCL Al₂O₃ (BHEAA) and BCL Al₂O₃ (2HEAA) and c) BCL free

3.5. X-Ray diffraction of the precursor Al₂O₃

Figure 5 b shows the diffractogram of the Al₂O₃ calcined at 350 °C. After the heat treatment at 350 °C can be seen more intense and defined peaks, compared with the result of Figure 5 a, subjected to a heat treatment of 110 °C. Peaks at $2\theta = 15.5^\circ$, 66.62° and 31.9° are related to the profile of the diffraction X-ray standard as Al₂O₃ record PCPDFWIW - 37-1462.

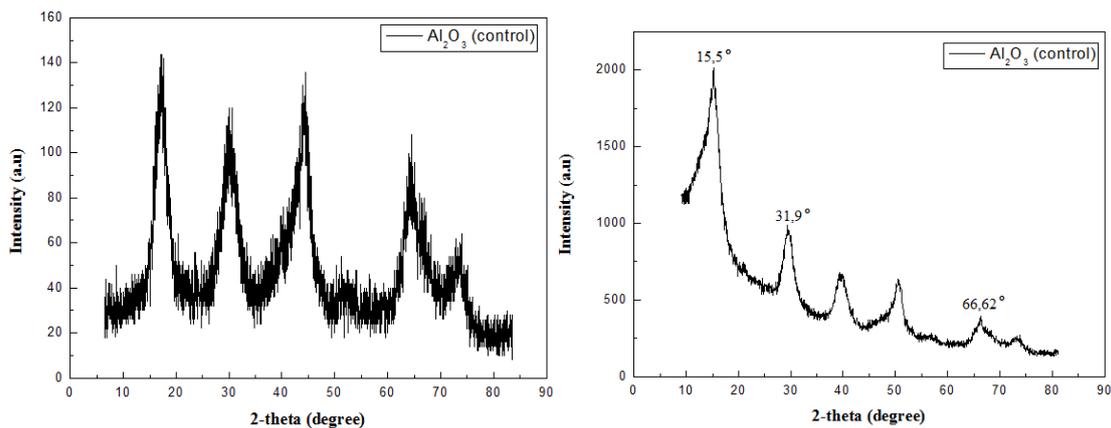


Fig. 5. a) Diffractogram of the Al_2O_3 dried at 110°C and b) Diffractogram of Al_2O_3 (control) calcined at 350°C .

Small angle XRD patterns of Al_2O_3 (control), Al_2O_3 GLU, Al_2O_3 (2mHEAA) GLU, Al_2O_3 (BHEAA) GLU and Al_2O_3 (2HEAA) GLU were showed as Figure 6 exhibited XRD pattern with well-resolved peaks proving the presence of Al_2O_3 in modified supports with PILs.

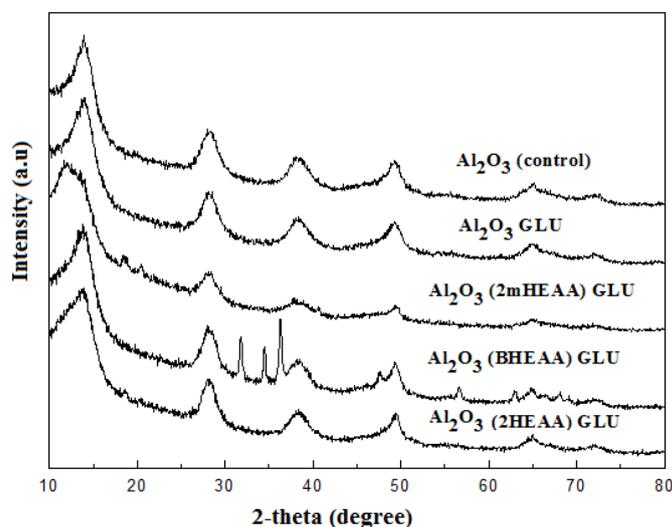


Fig. 6. Diffractograms Al_2O_3 (control), Al_2O_3 GLU, Al_2O_3 (2mHEAA) GLU, Al_2O_3 (BHEAA) GLU and Al_2O_3 (2HEAA) GLU.

Except the Al_2O_3 (BHEAA) GLU that presents a different and crystalline peaks in region between 30° e 40° , probably because the interaction of PIL (BHEAA) groups such as -OH and -NH with alumina [31]. But the diffractogram presented by Al_2O_3 (2mHEAA) GLU showed lower peak than the others, might be an interaction with PIL and support.

According to the table 3, the diameter of particles of Al₂O₃ (2mHEAA) GLU, Al₂O₃ (BHEAA) GLU and Al₂O₃ (2HEAA) GLU shows a change in comparison with the Al₂O₃ (control) of the 4.9 nm for next 3.45 nm and 3.14 nm, Al₂O₃ (2mHEAA) GLU and Al₂O₃ (2HEAA) GLU, respectively. And the unique exception was Al₂O₃ (BHEAA) GLU that increased the diameter of particle for 5.75 nm. Therefore, the use PIL influence the surface of the support. Andrade *et al.*, [32] suggest that the GLU influence in support change because of strong interactions with the amino group of APTS forming an imine bond and leaving the other aldehyde group to react with the amine residues of enzyme [33].

Table 3

Diameter of particles of Al₂O₃ samples with and without PILs

Samples	Diameter of particles (nm)
Al ₂ O ₃ (control)	4,9
Al ₂ O ₃ GLU	4,9
Al ₂ O ₃ (2mHEAA) GLU	3,45
Al ₂ O ₃ (BHEAA) GLU	5,75
Al ₂ O ₃ (2HEAA) GLU	3,14

Thus is necessary to suggest and confirmed the modification support with glutaraldehyde for immobilization using others analysis such as: SEM, FTIR and BET.

3.7 Scanning electron microscope (SEM)

As can be seen in Figure 7 a, the micrograph of Al₂O₃ surface morphology presents an irregular character with larger and smaller particle sizes. After the immobilization with *Burkholderia cepacia* lipase it can be seen a lot of granules compared with the support with no enzyme (Figure 7 b and 7 d). Because of their microporosity the immobilization occurs on the support surface, in counterpart to Moreno and Sinisterra [19], that immobilized on inorganic supports such as alumina, silica and controlled pore glass, lipase from *Candida cylindracea*, obtaining greater activity and stability from lipase immobilized on silica and alumina than their immobilized on pore glasses.

The morphological characteristics of the support materials used for immobilization. Observing Figure 7 a and 7 c has channels and after immobilization for BCL Al₂O₃ observed

possibility BCL in the surface (Figure 7 b) and BCL Al₂O₃ (2mHEAA) into of the channels (Figure 7 d).

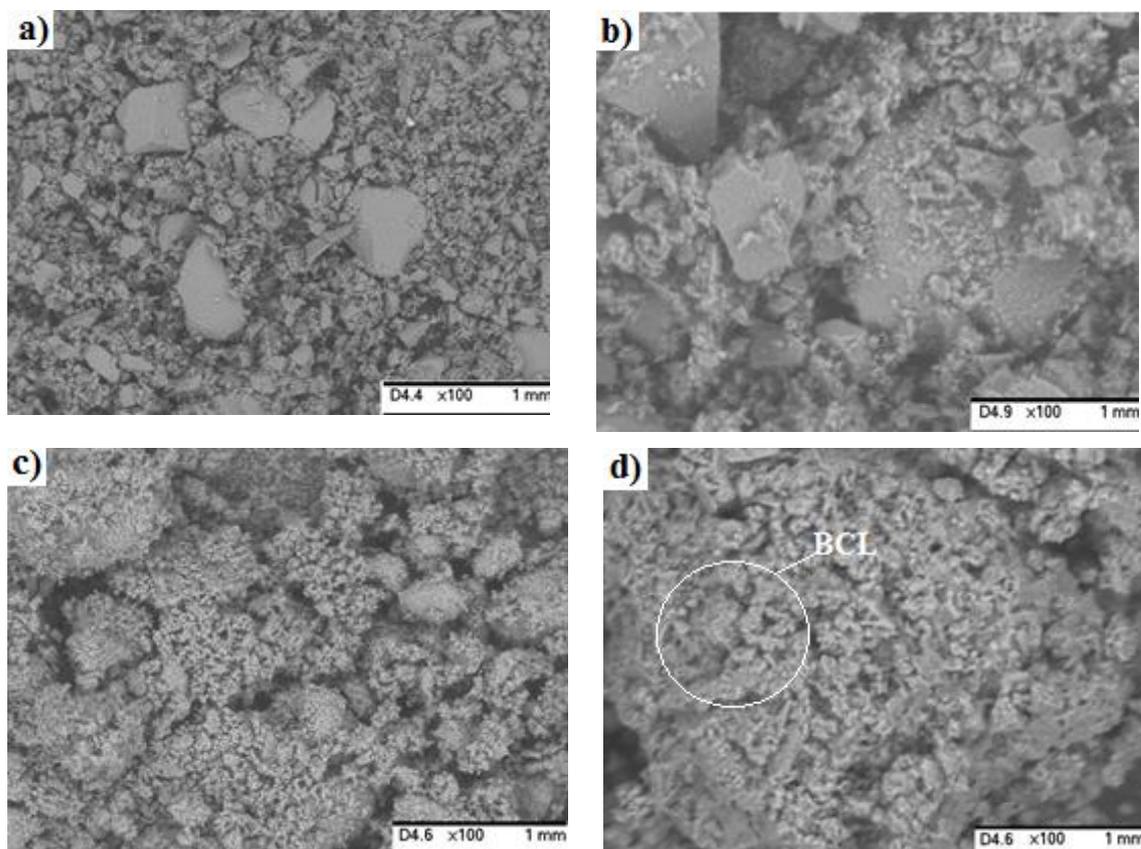


Fig. 7. Micrograph of a) Al₂O₃ control, b) BCL Al₂O₃, c) Al₂O₃ (2mHEAA) and d) BCL Al₂O₃ (2mHEAA).

Examining the Micrograph of Al₂O₃ (2mHEAA) and BCL Al₂O₃ (2mHEAA), Figure 8 c and d, it can be seen in comparison with Al₂O₃ control that the particle size was actually modified after the addition of the ionic liquid (2mHEAA), becoming smaller and rugosus, corroborating the results of X-ray diffraction. Figure 8 d, the BCL Al₂O₃ (2mHEAA), presents higher fill channel, indicating the enzyme presence.

3.8 Fourier Transformation Infrared Spectrum (FTIR)

FTIR is widely used to confirm the attachment of different functional groups in each step of functionalization [22]. The band between 500 and 1000 cm⁻¹ was considered as the characteristic absorption band of alumina. The intensive bands at 3000 and 3500 cm⁻¹ was assigned to the symmetric and asymmetric stretching of OH bond of water, according with the

humidity test and/or should belong to the stretching and bending modes of hydroxyl, like the weak peaks at 1636 cm^{-1} [34]. According to Mcmurry [35], the bands corresponding to wavelengths between 800 and 1300 cm^{-1} are connections of the C-C type of saturated alkanes and the bands to 1650 cm^{-1} , represents a alkene, C=C. Comparing the supports before the activation with the supports after activation with GLU, Al_2O_3 GLU, Al_2O_3 (2mHEAA) GLU, Al_2O_3 (BHEAA) GLU and Al_2O_3 (2HEAA) GLU, can observe an accent for the peaks, indicating a result of surface activation with GLU at supports, mainly Al_2O_3 (2mHEAA) GLU, that PIL 2mHEAA and Al_2O_3 (BHEAA) GLU show a more interaction with GLU (Figure 8), probably because of the positive effect of the PILs.

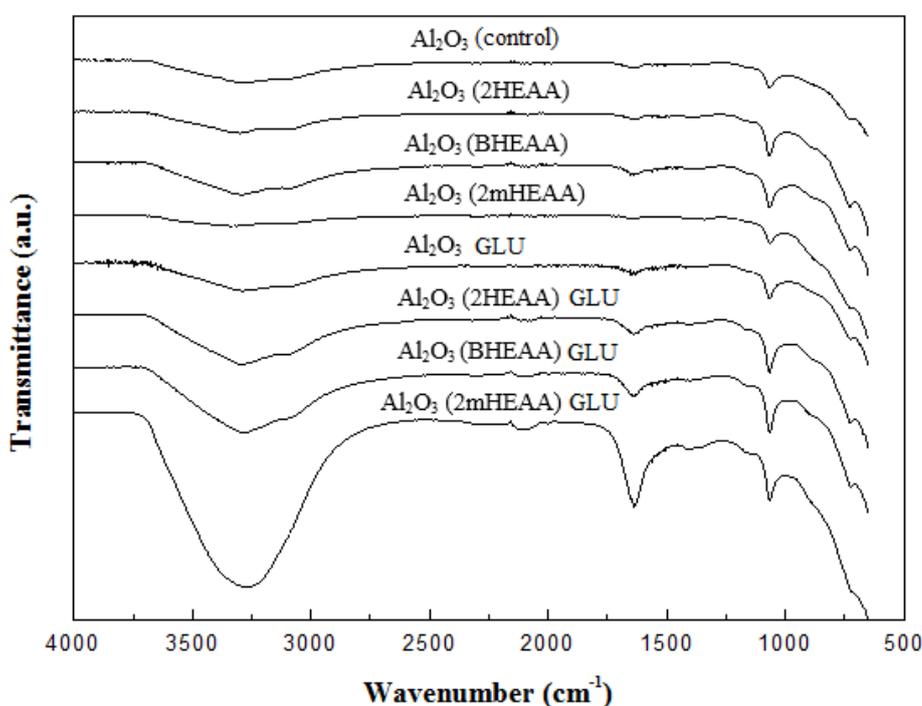


Fig. 8. FTIR spectra of the Al_2O_3 (control), Al_2O_3 (2mHEAA), Al_2O_3 (BHEAA) and Al_2O_3 (2HEAA).

The spectra with immobilized biocatalyst BCL Al_2O_3 , BCL Al_2O_3 (2mHEAA), BCL Al_2O_3 (BHEAA) and BCL Al_2O_3 (2HEAA) reveal a characteristic peaks at 1653 cm^{-1} , corresponding to the pure enzyme, being assigned to Amide I group and was equivalent a C=O stretching vibration of the amide group coupled to the in-plane N-H bending and C-N stretching modes. Other peak appear between 1000 and 1250 cm^{-1} , correspondent to Amide III group represents 30% C-N stretching; 30% N-H bending; 10% C=O stretching; 10% O=C-N bending and 20% other [36]. The peak at 2200 – 2400 cm^{-1} were attributed to the contribution of CO_2 in the environment. Because the appearance of this peak, which is

characteristic to the enzyme, could confirm that the enzyme covalent immobilization took place [37], mainly in the biocatalysts that presents the best immobilization yield, BCL Al₂O₃ (2mHEAA) and BCL Al₂O₃ (BHEAA) show a large band in all the spectrum, proving the major presence of enzyme (Figure 9).

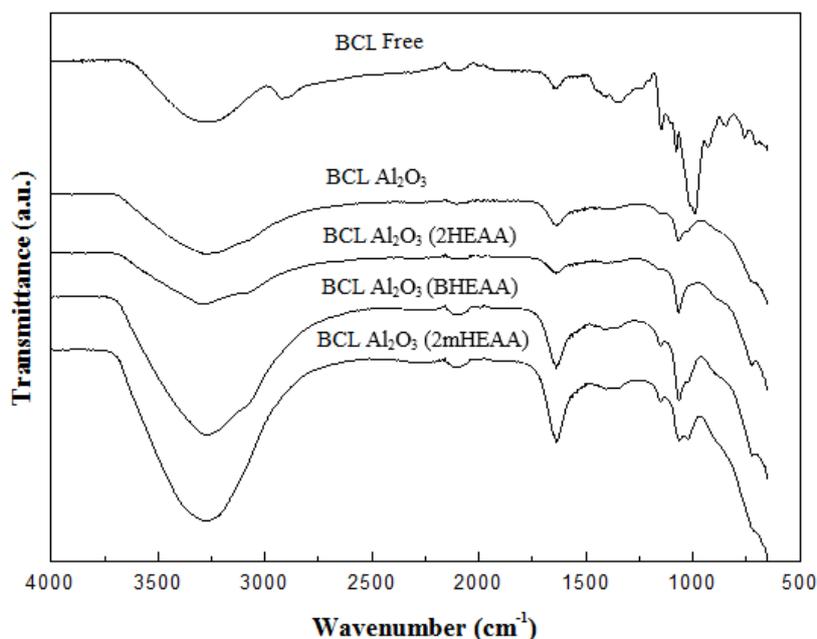


Fig. 9. FTIR spectra of the BCL Al₂O₃, BCL Al₂O₃ (2mHEAA), BCL Al₂O₃ (BHEAA) and BCL Al₂O₃ (2HEAA).

3.9. Nitrogen Adsorption-Desorption

The BET surface area, pore volume and pore size decreased after PILs modification. Introduction of PILs onto the Al₂O₃ shifted the pore volume from 0.3405 cc/g to 0.3232 cc/g from Al₂O₃ (BHEAA) GLU, 0.3120 cc/g from Al₂O₃ (2HEAA) GLU. This drop was consistent with the others researchers reported [38, 39, 40]. But the pore volume value from Al₂O₃ (2mHEAA) GLU was 0.3943 cc/g, i.e., increased, probably because of the high chemical stability due interaction with the environment from PIL (2mHEAA). Certainly, these results also suggested that PILs were modified the supports. Observing Table 4, can note the influence of glutaraldehyde in biocatalyst superficial area. The Al₂O₃ (control) demonstrated a large superficial area than the others modified with PILs because the GLU interact with the solid structure. According to Monsan [41], the attainment of stable products after glutaraldehyde reaction may involve stability between glutaraldehyde molecules and lipase.

The aldehyde groups conjugated with ethylenic double bonds react with amine functions primarily to give imine bonds stabilized.

The change in support area may be the result of conventional precipitation process carried out in a stirred tank that cannot control the even dispersion of the produced particles because of its poor micromixing [42].

Table 4

Values of the surface area, pore volume and pore size of the Al₂O₃ control and support with GLU influence and immobilized support.

Sample	S_{BET} (m ² /g)	Pore Volume (cc/g)	Pore size (nm)
Al ₂ O ₃ control	183.2	0.3405	3.18
Al ₂ O ₃ GLU	169.4	0.3307	1.66
Al ₂ O ₃ (2HEAA) GLU	153.3	0.3120	1.86
Al ₂ O ₃ (BHEAA) GLU	170.7	0.3232	2.87
Al ₂ O ₃ (2mHEAA) GLU	112.9	0.3943	2.87
BCL Al ₂ O ₃	111.5	0.3329	28.80
BCL Al ₂ O ₃ (BHEAA)	147.5	0.3684	35.76
BCL Al ₂ O ₃ (2HEAA)	124.9	0.3803	31.87
BCL Al ₂ O ₃ (2mHEAA)	94.7	0.4888	20.29

The immobilized biocatalysts Al₂O₃ (2mHEAA) GLU and Al₂O₃ (BHEAA) GLU shows a higher pore size than the Al₂O₃ GLU and Al₂O₃ (2HEAA) GLU. The increase of pore size could be relating to Glutaraldehyde (GLU) and PILs which may be acting as structural promoter causing improved dispersing effect on the enzyme in supports Al₂O₃ (2mHEAA) GLU and Al₂O₃ (BHEAA) GLU [32]. Although the Al₂O₃ (2mHEAA) GLU shows a smaller superficial area than the Al₂O₃ control, Al₂O₃ GLU, Al₂O₃ (2HEAA) GLU and Al₂O₃ (BHEAA) GLU but provides a greater dispersion of the enzyme.

In table 4, the pore size presented to the samples is small Al₂O₃ GLU – 1.66 nm, Al₂O₃ (2HEAA) GLU – 1.86 nm, Al₂O₃ (2mHEAA) GLU – 2.87 nm and Al₂O₃ (BHEAA) – 2.87 nm, compared to the literature Silica SBA-15 (8 nm) [1], Silica/Anodic Alumina (4 nm) [45], Silica Magnetic Microparticles (10 nm) [46]. According to Dong *et al.* [47], it is necessary that the pore size should be larger than the molecular size of the enzyme to ensure successful immobilization. Furthermore, when the size of material matches the dimension of the enzyme molecule, the enzyme is deeply absorbed into the internal surface of mesoporous material rather than on the external surface. On the other hand, Marques *et al.*, [48], studying the lipase selective entrapment in alginate from *Burkholderia cepacia* crude extract, discovered that the

large size of the alginate spheres had a negative influence in the immobilization rate. Smaller sizes had better immobilization yield results. In this study can observe that the increase of the pore size revealed for immobilized lipase onto support (Table 4)

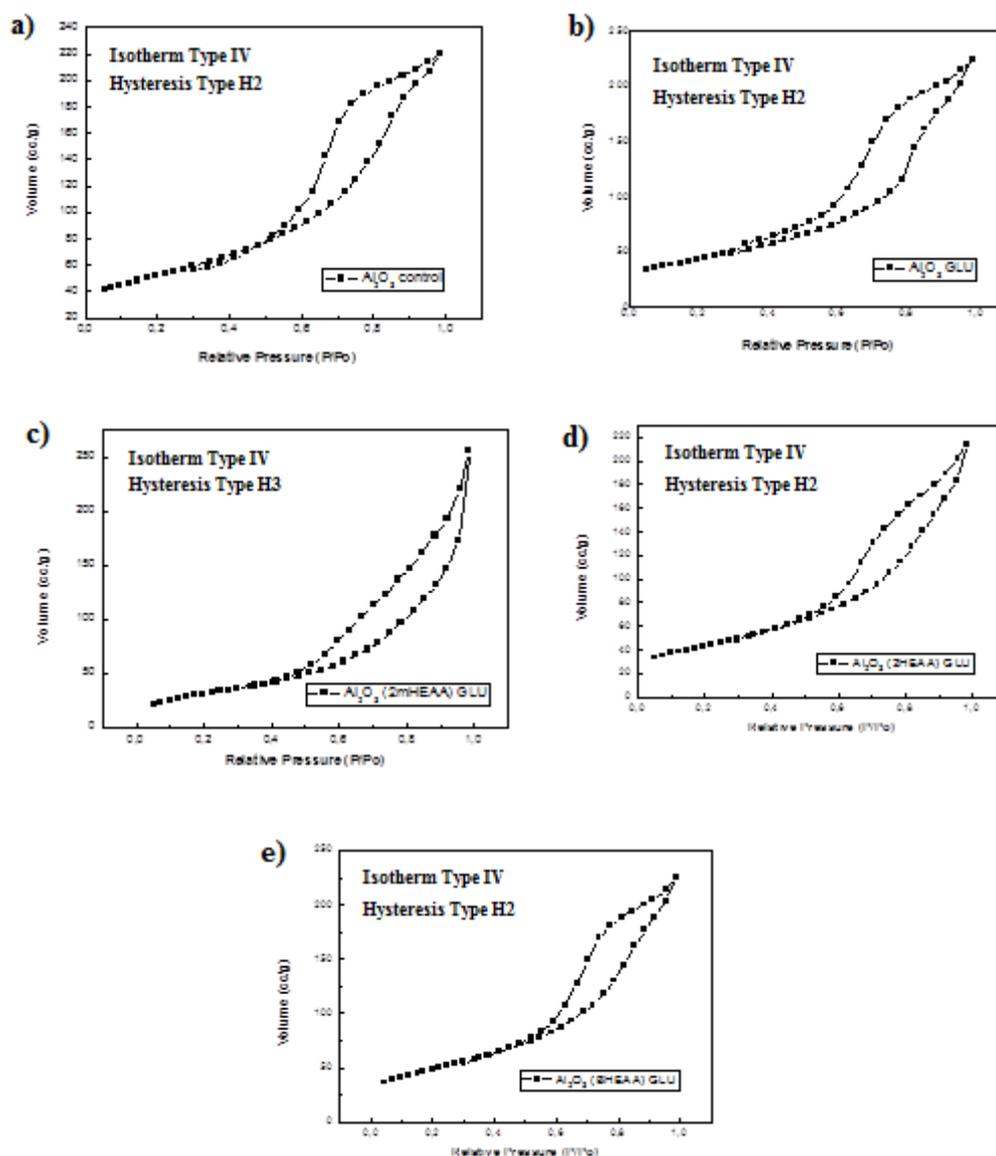


Fig. 10: Nitrogen adsorption-desorption isotherms of the alumina oxides supports: a) Al₂O₃ control, b) Al₂O₃ GLU, c) Al₂O₃ (2mHEAA), d) Al₂O₃ (2HEAA).and e) Al₂O₃ (BHEAA).

The Al₂O₃ isotherms (Figure 10 a, b, d and e), presents type IV and Hysteresis type H2 for Al₂O₃ (control), Al₂O₃ GLU, Al₂O₃ (2HEAA) GLU and Al₂O₃ (BHEAA). According to Sing [43] inorganic oxide tends to show a distribution of pore size and shape not well-defined, attributed to a difference in mechanism between condensation and evaporation processes occurring in pores with narrow necks and wide bodies but it is now recognised that this provides an over-simplified picture and the role of network effects must be taken into account.

The narrow loops attribute to the large number of micropores [44]. The Al_2O_3 (2mHEAA) GLU shows an isotherm type IV and hysteresis type H3, common in an assemblage of particles of plate-like [43].

The isotherms of BCL Al_2O_3 samples (Figure 11) showed that the hysteresis loops became small and narrow after immobilization for the best lipolytic activity BCL Al_2O_3 (2mHEAA) and BCL Al_2O_3 (BHEAA). Confirmed by decreasing the surface area of the samples and considerable increase in pore size, evidencing the covalent bonding of the enzyme on the support.

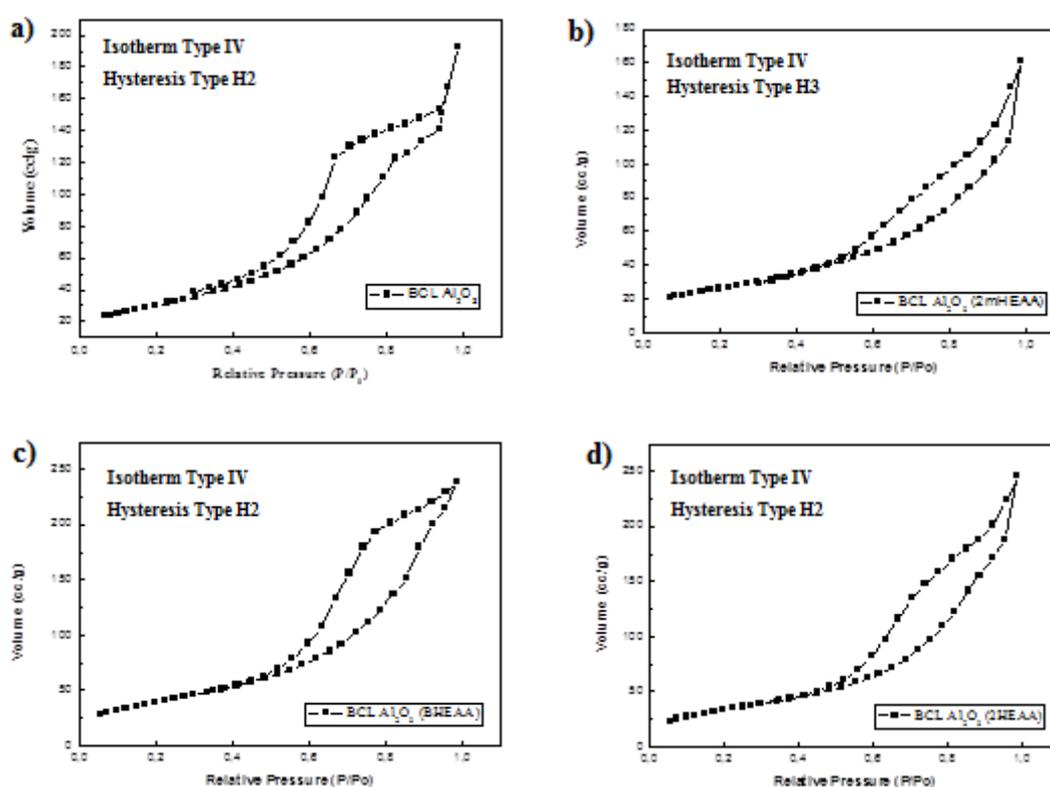


Fig. 11: Nitrogen adsorption-desorption isotherms of the aluminum oxides biocatalysts: a) BCL Al_2O_3 , b) BCL Al_2O_3 (2mHEAA), c) BCL Al_2O_3 (BHEAA) and d) BCL Al_2O_3 (2HEAA).

4. Conclusion

This study showed that the Al₂O₃ modified with PILs presented best lipolytic activity, immobilization yield, operational and thermal stability results. The BCL Al₂O₃ (2mHEAA) demonstrated the best immobilization yield with 204.43%, lipolytic activity 740.98 U/g and recyclability was 4 cycles along with the BCL Al₂O₃ (BHEAA) that the immobilization yield was 67.8%, 603.06 U/g of lipolytic activity and recyclability was 3 cycles. Both showed best thermal stability in 37°C.

These improvements were associated with changes in pore structure and enzyme-support surface interactions. The structural analysis by N₂ adsorption-desorption isotherms, showed that the Al₂O₃ was substantially unaffected by the presence of the lipase. They demonstrated a successful incorporation of functionalized protic ionic liquids with changes in the structural and textural properties. FTIR analyses proved the occurrence of changes in the chemical composition as a consequence of functionalization and immobilization reactions. The appearance of an enzyme characteristic peak in the spectrum of membrane with immobilized enzyme confirms the success of immobilization reaction. The micrographs demonstrated that PIL (2mHEAA) greatly influenced in alumina morphology corroborating with the results of X-ray diffraction. The particle size becoming smaller and rugosus. The study demonstrates the feasibility of immobilized *Burkholderia cepacia* lipase in Al₂O₃ supports modified with PILs because reduce the usage cost and simplify the separation process.

5. Acknowledgments

The team appreciates the support received from the ITP/UNIT, CNPq, BNB, REDE H₂ and ICP/CSIC. The present work was performed within the research program supported by the MICINN (Spain) under Project PIB2010Z-00531.

6. References

- [1] Hu, Y.; Tang, S.; Jiang, L.; Zou, B.; Yang, J.; Huan, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*. 47 (2012) 2291–2299.
- [2] Shang, C-Y.; Li, W-X.; Jiang, F. Zhang, R-F. Improved enzymatic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on ZnO nanowires/macroporous SiO₂ microwave absorbing supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 113 (2015) 9-13.
- [3] Wiącek, A.E. The wetting and interfacial properties of alumina surface treated with dipalmitoylphosphatidylcholine and lipase enzyme. *Powder Technology*. 212 (2011) 332-339.
- [4] Mohammadi, M.; Habibi, Z.; Dezvarei, S.; Yousef, M.; Ashjari, M. Selective enrichment of polyunsaturated fatty acids by hydrolysis of fish oil using immobilized and stabilized *Rhizomucor mihei* lipase preparations. *Food and Bioproducts Processing*. 94 (2015) 414-421.
- [5] Kumar, D.; Nagar, S.; Bhushanc, I.; Kumar, L.; Parshad, R.; Gupta, V. K. Covalent Immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 87 (2013) 51–61.
- [6] Taylor, R.F.: Commercially available supports for protein immobilization, in protein immobilization: fundamentals and application. *Inc, New York*. (1991) 139-160.
- [7] Malcata, F.H., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and C.H. Amundson: Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. *JAOCS*. 67 (1990) 890-909.
- [8] Pirozzi, D.; Fanelli, E.; Aronne, A.; Pernice, P.; Mingione, A. Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol-gel synthesis and catalytic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 59 (2009) 116-120.
- [9] Ha, T-J.; Park, H-H.; Kang, E. S.; Shin, S.; Cho, H. H. Variations in mechanical and thermal properties of mesoporous alumina thin films due to porosity and ordered pore structure. *Journal of Colloid and Interface Science*. 345 (2010) 120–124.
- [10] Zhao, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85 (2010) 891–907.
- [11] Fauzi, A. H. M.; Amim, N. A. S. An overview of ionic liquid as solvents in biodiesel synthesis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16 (2012) 5770 – 5786.
- [12] Soares, C.M.F.; Castro, H.F.; Moraes, F.F.; Zanin, G.M.. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemical Biotechnology*. (1999) 745-758.
- [13] Cabrera-Padilla, R. Y.; Melo, E. B.; Pereira, M. M.; Figueiredo, R. T.; Fricks, A. T.; Franceschi, E.; Lima, A. S.; Silva, D. P.; Soares, C. M. F. Use of ionic liquids as additives for the immobilization of lipase from *Bacillus sp*. *Journal of Chemycal Technology*. 2014.

- [14] Gorman, L. A. S.; Dordick, J. S. Organic Solvents Strip Water off Enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*. 39 (1992) 392-397.
- [15] Wang, X.-Y.; Jiang, X.-P.; Li, Y.; Zeng, S.; Zhang, Y.-W. Preparation Fe₃O₄ chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 75 (2015) 44-50.
- [16] Chemical Spider. Log P. Disponível em: < <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13835336.html?rid=d114fb1b-9265-4723-ab8e-3e574d27b3ec>>. Acesso em: 17 mai 2015.
- [17] Zhao, D., Wu, M. Ionic Liquids: applications in catalysis. *Catalysis Today*. 74 (2002) 157-189.
- [18] Gao, W.-W.; Zhang, F.-X.; Zhang, G.-X.; Zhou, C.-H. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis – Review. *Biochemical Engineering Journal*. 99 (2015) 67-84.
- [19] Moreno, J.M.; Sinisterra, J V. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. *Journal of Molecular Catalysis*. 93 (1994) 357-369.
- [20] 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*. 1547 (2001) 329-338.
- [21] Ozyilmaz, E.; Bayrakci, M.; Yilmaz, M. Improvement of catalytic activity of *Candida rugosa* lipase in the presence of calix[4]arene bearing iminodiacarboxylic/phosphonic acid complexes modified iron oxide nanoparticles. *Bioorganic Chemistry*. 2015.
- [22] Salehi, Z.; Ghahfarokhi, H.H.; Kodadadi, A.A.; Rahimnia, R. Thiol and urea functionalized magnetic nanoparticles with highly enhanced loading capacity and thermal stability for lipase in transesterification. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. (2016).
- [23] Yilmaz, E. Sezgin, M.; Yilmaz, M. Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin. *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*. 62 (2010) 162-168.
- [24] Martin, M. T.; Alcalde, M.; Ballesteros, A.; Plou, F.J.; Dijkhuizen, L. Synthesis of malto-oligosaccharides via the acceptor reaction catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferases. *Biocatalysis and Biofransformafron*. 19 (2001) 21 -35
- [25] Jani, A.M.M.; Losic, D.; Voelcker, N.H. Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications. *Progress in Materials Science*. 58 (2013) 636–704.
- [26] Nagar, S.; Mittal, A.; Kumar, D.; Kumar, L.; Gupta, V. K. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. *Process Biochemistry*. 47 (2012) 1402–1410.

- [27] Vaidya, A.; Gera, G.; Ramakrishna, S. Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 24 (2008) 2987–2995.
- [28] Lee, C.-H.; Lin, T.-S.; Mou, C.-Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes - Review. *Nano Today*. 4 (2009) 165-179.
- [29] Khumchoo, N.; Khaorapong, N.; Ogawa, M. Formation of zinc oxide particles in cetyltrimethylammonium-smectites. *Applied Clay Science*. 105 (2015) 236-242.
- [30] Souza, R.L., Faria, E.L.P., Figueiredo, R.T., Freitas, L.S., Iglesias, M., Mattedi, S., Zanin, G.M., Santos, O.A.A., Coutinho, J.A.P., Lima, A.S. Protic Ionic liquid as additive on lipase immobilization using sílica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, in Press. 52 (2013) 141-15.
- [31] Li, X.; Zhou, H.; Wu, W.; Wei, S.; Xu, Y.; Kuang, Y. Studies of heavy metal ion adsorption on Chitosan/Sulfhydryl functionalized graphene oxide composites. *Journal of Colloid and Interface Science*. 448 (2015) 389-397.
- [32] Andrade, L.H.; Rebelo, L.P.; Netto, C.G.C.M.; Toma, H.E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by diferente methodologies on supermagnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 66 (2010) 55-62.
- [33] MansouriMajd, S.; Teymourian, H.; Salimi, A.; Hallaj, R. Fabrication of electrochemical theophylline sensor based on manganese oxide nanoparticles/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Electrochemical Acta*. 108 (2013) 707-716.
- [34] Yu, J.; Bai, H.; Wang, J.; Li, Z.; Jiao, C.; Liu, Q.; Zhang, M.; Liu, L. Synthesis of alumina nanosheets via supercritical fluid technology with high uranyl adsorptive capacity. *New Journal of Chemical*. 37 (2013) 366.
- [35] McMurry, J. *Química Orgânica*. São Paulo. 1(2013) 398-407.
- [36] Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Analytical Techniques in the Sciences*. (2004).
- [37] Sandu, T.; Sarbu, A.; Damian, C.M.; Patroi, D.; Iordache, T.V.; Budinova, T.; Tsyntsarki, B.; Yardim, M.F.; Sirkecioglu, A. Functionalized bicomponent polymer membranes as supports for covalent immobilization of enzymes. *Reactive and Functional Polymers*. 96 (2015) 5-13.
- [38] Zou, B.; Hu, Y.; Yu, D.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. *Biochemical Engineering Journal*. 53 (2010) 150–153.
- [39] Bian, W.; Yan, B.; Shi, N.; Qiu, F.; Lou, L.-L.; Qi, B.; Liu, S. Room temperature ionic liquid (RTIL) – decorated mesoporous silica SBA-15 for papain immobilization: RTIL increased the amount and activity of immobilized enzyme. *Materials Science and Engineering C*. 32 (2012) 364-368.

- [40] Jiang, N.; Jin, H.; Mo, Y.-H.; Prasetyanto, E.A.; Park, S.-E. Direct immobilization of ImCl ionic liquid onto the platelet type SBA-15. *Microporous and Mesoporous Materials*. 141 (2011) 16–19.
- [41] Monsan, P. Optimization of glutaraldehyde actjyation of a support for enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis*. 3 (1978) 371- 384.
- [42] Zhao, R.-H.; Li, C.-P.; Guo, F.; Chen, J.-F. Kinetics, catalysis, and reaction engineering. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46 (2007) 3317-3320.
- [43] Sing, K.S.W.; Everett, D.H.; Haul; R.A.W.; Moscou, L.; Pierotti, R.A.; Rouquerol, J.; Siemieniewska, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure & Applied. Chemycal*. 57 (1985) 603-619.
- [44] Wang, F.; Zhang, Z.; Yang, J.; Wang, L.; Lin, Y.; Wei, Y. Immobilization of room temperatura ionic liquid (RTIL) on silica gel for adsorption removal of thiophenic sulfur compounds from fuel. *Fuel*. 107 (2013) 394-399.
- [45] Maeda, K.; Ichinose, K.; Yamazaki, T.; Suzuki, T. Preparation of mesostructured silica/anodic alumina composite membranes in mild conditions using acetic acid. *Microporous and Mesoporous Materials*. 112 (2008) 603-611.
- [46] Kopp, W.; Silva, F.A; Lima, L.N.; Masunaga, S.H.; Tardioli, P.W.; Giordano, R.C.; Araújo-Moreira, F.M.; Giordano, R.L.C. Synthesis and Characterization of robust magnetic carries for bioprocess applications. *Materials Science and Engineering B*. 193 (2015) 217-228.
- [47] Dong, M.; Wu, Z.; Lu, M.; Wang, Z.; Li, Z. Combining the Physical Adsorption Approach and the Covalent Attachment Method to Prepare a Bifunctional Bioreactor. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (2012) 11443-11454.
- [48] Marques, P. P.; Monte Alegre, R.; Tambourgi, E. B. Lipase selective entrapment in alginate from *Burkholderia cepacia* crude extract. *Chemical Engineering Transactions*. 24 1009-(2011) 1014.

PATENTE

Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em óxido de magnésio com finalidade cosmética.

Inventores:

Ingrid Cavalcanti Feitosa
Luma Mirely de Souza Brandão
Cleide Mara Faria Soares
Renan Tavares Figueiredo
Álvaro Silva Lima

Depósito da Patente:

PATENTE

Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em óxido de magnésio com finalidade cosmética.

A presente invenção corresponde à imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*, utilizando o método de ligação covalente, no óxido metálico MgO (óxido de magnésio) com finalidade cosmética no intuito de remover os lipídios excessivos da pele e efetuar uma limpeza gradativa destas biomoléculas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As lipases (glicerol-ester-hidrolases, E.C.3.1.1.3) são um importante grupo biotecnologicamente relevantes de enzimas que podem ser aplicadas em diversos ramos da indústria e são encontradas em microrganismos, animais e plantas (HASAN *et al.*, 2009). Dentre as lipases, as microbianas são amplamente utilizadas devido à sua facilidade de extração e seus altos rendimentos (GUPTA *et al.*, 2013).

Uma das lipases mais populares, usadas em síntese orgânica nas reações de hidrólise e transesterificação é a lipase de *Burkholderia cepacia*, anteriormente denominada de *Pseudomonas cepacia*. Ela é considerada como uma bactéria ubíqua, classificada como bacilo gram-negativo que possuem temperatura ótima de crescimento entre 30-35°C, não esporulada, móvel, da família *Pseudomona daceae*. Seus habitats primários incluem sedimentos dos rios, solo e plantas (BERRIATUA *et al.*, 2001).

A *Burkholderia cepacia* é utilizada para a produção de lipases gerando enzimas com grande estabilidade em solventes orgânicos e um alto grau de enantioseletividade, fazendo com que sejam utilizadas na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros. E geralmente as lipases de *Burkholderia cepacia* são utilizadas após a imobilização a fim de se obter biocatalisadores imobilizados e com maior estabilidade operacional (JAEGER *et al.*, 1999).

A especificidade é uma característica importante das lipases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidas: a primeira é a especificidade em relação à

classe de lipídios. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo di-, tri-, ou monoglicerídeo, colesterol éster, metil éster, etc. A segunda é a região-especificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade com relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a enzima lipolítica é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereo-especificidade, ou seja, algumas destas enzimas catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros (COSTA & AMORIM, 1999; SOARES *et al.*, 2000).

Apesar das suas inúmeras vantagens, as enzimas possuem desafios a serem ultrapassados para utilização em escala industrial, devido ao seu alto custo, dificuldade de separação do meio reacional e a desnaturação da sua estrutura devido às condições severas de temperatura, pH, agitação, etc (GUPTA *et al.*, 2013). Para contornar essas desvantagens das enzimas são aplicadas técnicas de imobilização que por definição são aquelas que se encontram confinadas em uma estrutura, contendo barreiras (suporte) que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio reacional, tornando-as pouco solúveis, independente do meio (GIRELLI e MATTEI, 2005).

As técnicas de imobilização de biocatalisadores bem como a seleção do suporte têm demonstrado nos últimos anos um crescente aumento, devido à demanda da utilização de enzimas em escala industrial (DHAKA *et al.*, 2013). A utilização de partículas inorgânicas como suporte para a imobilização é particularmente relevante para reações em fase orgânica devido à sua excelente estabilidade química e inércia em meios orgânicos. Muitos materiais inorgânicos podem ser facilmente fabricados na forma de nanopartículas com áreas superficiais elevadas, facilitando com isso a dispersão das enzimas nas reações interfaciais (CHEN *et al.*, 2009).

Existem muitos estudos na literatura com suportes inorgânicos e imobilização de enzimas, principalmente sílica mesoporosa. No entanto, apenas poucos estudos sobre a utilização de óxidos metálicos, como óxido de zinco e alumínio e nenhum estudo sobre o óxido de magnésio.

Estudos têm apresentado resultados promissores em relação à imobilização de enzimas em suportes de óxidos metálicos, devido a estes pertencerem a uma importante classe de

catalisadores heterogêneos que devido ao seu alto nível de quimio-seletividade, compatibilidade ambiental, simplicidade de operação e disponibilidade a baixo custo, são conhecidos por suas aplicações industriais como adsorventes, catalisadores e suportes de biocatalisadores (THAKURIA e BORAH, 2007; SEKIZAWA *et al.*, 2000; THAKURIA *et al.*, 2007).

Alguns estudos como os de RAHMAN e colaboradores (2008), utilizaram como suporte para a síntese de ésteres metil adipato, com lipase de *Candida rugosa*, os hidróxidos de Mg, Zn e Ni, utilizando a adsorção física como método de imobilização. Obtendo um rendimento (carga de proteína) de 71% (Mg/Al-NO₃), 67% (Zn/Al-NO₃), e 58% (Ni/Al-NO₃), respectivamente devido à maior área de superfície, a porosidade e espaçamento basal dos suportes.

SHANG *et al.* (2014), no seu estudo de imobilização da lipase de *Candida antártica* em uma mistura de sílica macroporosa e nanotubos de ZnO, conseguiram excelentes resultados devido à excelente estabilidade térmica do ZnO, onde mesmo às altas temperaturas o suporte permanecia química e morfologicamente inalterado.

KJELLANDER *et al.* (2013), estudaram a cinética do sistema de fluxo, triagem e estabilidade da imobilização da transferase glutatione em suportes nanoporosos de alumina anodizada pelo método de ligação covalente. E concluíram que trabalhar com enzimas imobilizadas num reator de leito fixo apresenta inúmeras vantagens, como: economia e estabilidade das enzimas e uma melhoria na reprodutibilidade dos experimentos. As membranas de alumina nanoporosas apresentaram uma quantidade alta de enzima por volume, boas propriedades de fluxo e possibilidade de design modular com arranjo seqüencial das enzimas em sistemas multi-enzimas.

A indústria cosmética nos dias atuais está cada vez mais procurando rotas alternativas à indústria química, devido a uma série de complicações provenientes desta, referentes à sustentabilidade. A biocatálise mostra uma vantagem distinta em comparação à via química em termos de simplificação dos processos, a qualidade do produto, e redução da formação de resíduos. As lipases são as enzimas mais utilizadas em síntese catalítica na indústria cosmética, por conta da sua capacidade de reconhecer uma grande variedade de substratos (óleos e gorduras) e catalisar um grande número de reações (KHAN E RATHOD, 2015).

A lipase é uma enzima até o momento, muito utilizada na indústria de limpeza para a remoção de óleos e gorduras, como por exemplo na formulação de detergentes para remover manchas gordurosas provenientes de gorduras de fritura, óleos, sebo ou batons gordurosos (GUPTA *et al.*, 2013). Na indústria cosmética as lipases de diferentes fontes são utilizadas como aditivos de produtos de limpeza de pele e anti-acne para a remoção dos lipídios excessivos da pele (US 6.303.752 B1). Ainda se relata o uso destes aditivos na formulação de shampoos com a finalidade de limpar o couro cabeludo atuando na remoção do sebo e da caspa (JP 2001398511). Por fim, o uso da lipase nestes produtos deve-se a capacidade deste biocatalisador em hidrolisar triglicerídeos a diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos (SOARES *et al.*, 2000).

Em geral, os produtos contendo enzimas são utilizados na indústria cosmética para as condições em que é desejável remover as camadas superiores da pele. Neste processo, denominado de esfoliação, a pele que removida é geralmente substituída pela pele recém-gerada a partir de estruturas circundantes do ser vivo (US 20030026794).

As dosagens adotadas nestes cremes utilizando as microcápsulas, utilizam protocolos da indústria cosmética e dermatológica, utilizando agentes gelificantes e tensoativos, com características hidrofílicas ou lipofílicas, conservantes, solventes, fragrâncias, coloração, etc (US 5.788.972). Na Tabela 1 tem-se a indicação, de forma generalizada, da porcentagem dos aditivos utilizados na produção de cremes na indústria farmacêutica e cosmética.

Alguns estudos relatam a produção de cremes utilizando lipases na forma encapsulada, sob a forma de microcápsulas ou de microgrânulos, que podem ser esmagados no momento da aplicação, por fricção, permitindo o contato da lipase com a pele, fazendo com que haja a liberação do ingrediente ativo livre na pele (US 5.788.972). Até o momento as microcápsulas ou os microgrânulos descritas na literatura são constituídas por materiais sintéticos, como: polímeros de acrilamida; polímeros à base de anidrido maleico; polivinil pirrolidona; polipeptídeos construídos, etc. Os naturais podem ser: celulose, agarose, dextrano, carragenina, amido, etc. Estas lipases imobilizadas por encapsulamento em microcápsulas ou em microgrânulos são utilizadas como meio de transporte inerte, adequado para aplicação tópica, sendo um veículo cosmeticamente e/ou dermatologicamente aceitável, compreendendo, geralmente, uma solução aquosa ou alcoólica, ou emulsões de água em óleo, que podem ter aparência de creme ou gel (US 4.556.554).

Tabela 1. Estimativa de quantificação dos aditivos utilizados na produção de cremes na indústria farmacêutica e cosmética (US 5.788.972).

Fase Oleosa	(%)
Triceteareto – 4 fosfato/sódio C ₁₄ —C ₁₇ sulfonato seco de alquila	6%
Petrolatum (Óleo mineral)	2%
Óleo Mineral	4%
Dimeticone	3%
Ciclometicone	3%
Dimeticone copoliol (Surfactante)	1%
Triclosan (Conservante)	0,1%
Palmitato de retinol	1%
Fase aquosa	
Propileno glicol (Umectante)	2%
PEG 20 (Organoléptica)	1%
LIPOLASE 100 L	1%
Fenoxietanol (Conservante)	0,4%
Água	75%

Na indústria da beleza de forma ampla, faz-se necessário caracterizar o mercado dos cosméticos e entender a sua evolução. O Brasil está em busca de maiores investimentos de matérias-primas para cosméticos (MATOS *et al.*, 2015). De acordo com o SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas), a previsão de investimentos na indústria cosmética para 2015 foi de 50 bilhões em comparação com os 27,3 bilhões gastos em 2010. Segundo dados, mesmo com a crise econômica, o mercado de beleza continua em crescimento exponencial devido à sua importância em elevar a auto-estima da população e para garantir uma boa aparência na busca por emprego.

A possibilidade de usar esses materiais na indústria cosmética aparenta ser promissor, devido ao baixo custo dos investimentos, como: os materiais empregados serem acessíveis economicamente, pela simplicidade e curto prazo da técnica empregada para a formação do óxido de magnésio, imobilização da enzima e confecção do creme, bem como o grau de especialização empregado para desenvolver as atividades, podem ser de nível técnico ou superior na área de ciências exatas, farmacêutica e biológicas.

Os artigos e as patentes utilizados para dar embasamento ao trabalho, demonstram a ampla utilização da lipase na indústria cosmética e áreas afins. Devido à necessidade de desenvolvimento de novas técnicas ou variações com significativo grau de modificação em relação à técnica original, que permitam o emprego de novos suportes para imobilização de enzimas.

Dentre os os documentos citados, não foi verificado o método de imobilização de lipase utilizando como suporte o óxido de magnésio (MgO) para a indústria cosmética ou afins foi utilizado, demonstrando por si só o caráter inovador da presente invenção quanto a finalidade cosmética no intuito de remover os lipídios excessivos da pele e efetuar uma limpeza gradativa destas biomoléculas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção consiste em imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* por ligação covalente em óxido de magnésio (MgO), que é um material inerte, quando utilizado em pequenas concentrações e insolúvel em água. Para aplicação na indústria cosmética através de cremes de uso tópico para a diminuição da oleosidade de peles acnéicas, devido às propriedades da lipase de *Burkholderia cepacia* de digerir óleos e gorduras. A sua imobilização em óxido de magnésio, possibilita a indústria cosmetológica a trabalhar com um material não tóxico que permite a ação gradual da enzima. Por conta da sua insolubilidade em água, o óxido de magnésio irá propiciar a liberação gradativa da enzima, bem como servirá como esfoliante, quando friccionado sobre a pele.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Para a preparação do suporte organometálico MgO desta invenção utilizou-se como agente precipitante NH₄OH em banho-maria a uma temperatura de +/- 60°C, sob agitação mecânica. O pH da solução formada foi mantido entre 8,0 – 8,5, adicionando NH₄OH quando era preciso. Após todo o processo de formação do precursor, o mesmo foi levado ao reator para a calcinação, durante 7 horas a uma temperatura de 350°C. Para a imobilização do biocatalisador por ligação covalente, foi deixado o suporte MgO imerso em γ -aminopropiltriétoxisilano (γ -APTS) 0,5% (v/v), durante 3 horas numa temperatura de 75°C sobre agitação no rota-evaporador. Após esse período, o suporte foi lavado com heptano e seco na estufa por um período de 15 horas a uma temperatura de 105°C. Após a silanização do suporte, este foi colocado imerso em glutaraldeído por 1h. Após a ativação, a solução

enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia* foi inserida, com um carregamento de 0,3g enzima/g suporte sob uma agitação amena, durante um período de 3 horas. Após a imobilização da enzima foi realizada a adição do biocatalisador imobilizado no creme em diferentes proporções conforme descrito na Tabela 2: 0,25%; 0,5%; 0,75% e 1% (p/p).

Tabela 1. Preparação dos cremes utilizando as diferentes proporções de lipase de *Burkholderia cepacia* em óxido de magnésio com finalidade cosmética.

<u>Fase oleosa</u>	(%)	(%)	(%)	(%)
LBC MgO	0,25	0,5	0,75	1
Glicerina	2	2	2	2
Óleo de semente de girassol	1	1	1	1
Dimeticona	3	3	3	3
Etil hexilglicerina	1,5	1,5	1,5	1,5
Ceteareth-33	2	2	2	2
Sorbitan Isostearate	2	2	2	2
Polysorbate 60	3	3	3	3
Goma xantana	1	1	1	1
Sorbitol	2,5	2,5	2,5	2,5
<u>Fase aquosa</u>				
Estearato de PEG-100	1	1	1	1
Limoneno	2	2	2	2
Geraniol	1	1	1	1
Phenoxyethanol	0,4	0,4	0,4	0,4
Alecrim (extrato da folha)	1	1	1	1
Acrilato de sódio	2	2	2	2
Álcool Benzílico	2	2	2	2
Água	72,35	72,1	71,85	71,6

MATERIAIS E MÉTODOS

- Enzima

A lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi adquirida da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EUA), com atividade lipolítica média de 2500 U/g enzima (sólido em pH 7,0).

- **Nitrato de Magnésio ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)**

Adquirido da Vetec Química Fina Ltda

- **Hidróxido de Amônio (NH_4OH)**

Adquirido da Vetec Química Fina Ltda

- **Hexano C_6H_{14}**

Adquirido da Vetec Química Fina Ltda

- **Glutaraldeído $C_5H_8O_2$**

Adquirido da Vetec Química Fina Ltda

- **γ -Aminopropiltriétoxisilano (γ -APTS)**

Adquirido da Aldrich

METODOLOGIA

Preparação do Óxido de Magnésio

Para a formação do óxido de magnésio foi colocado em um bécker um certo volume do agente precipitante hidróxido de amônio (NH_4OH), em banho-maria a temperatura de $60^\circ C$, sob agitação mecânica. De forma lenta, por meio de um funil de bromo, foi adicionado à solução de $Mg(NO_3)_2$ (Nitrato de Magnésio), durante 30 min. O pH da solução formada foi mantido entre 8,0 – 8,5, adicionando NH_4OH quando era preciso. O precipitado formado foi agitado durante 30 min, sem aquecimento e lavado com 3L de água deionizada. Posteriormente foi levado para a secagem na estufa durante 12hrs numa temperatura de $106^\circ C$. Após o processo de secagem, o precursor foi levado ao reator para a calcinação, durante 7 h a $350^\circ C$.

Imobilização do biocatalisador por Ligação Covalente

Para a imobilização do biocatalisador por ligação covalente, foi deixado o suporte MgO imerso em γ -APTS 0,5% (v/v), durante 3h numa temperatura de $75^\circ C$ sobre agitação no rotaevaporador. Após esse período, o suporte foi lavado com heptano e seco na estufa por um período de 15 horas a uma temperatura de $105^\circ C$. Após a silanização do suporte, este foi

colocado imerso em glutaraldeído por 10 min. E posteriormente em banho- maria à temperatura ambiente (25°C) por 1 h. Em seguida foi lavado com água destilada e embebido em solução de hexano, na proporção (10:1), durante 15 min, sob agitação amena. Logo após, foi adicionada a solução enzimática de *Burkholderia cepacia* (0,3g de enzima dissolvidas em 10 mL de água mili-Q, sendo que para cada grama do suporte é adicionado 0,3 gramas da enzima) sob uma agitação amena, durante um período de 3 h. Em seguida, o material permanece em repouso por 24 h, numa temperatura de 4°C. O biocatalisador imobilizado então foi lavado com hexano, na proporção de 20:1.

Atividade Lipolítica

A atividade lipolítica do biocatalisador imobilizado foi realizado pelo método de emulsão de óleo de oliva de SOARES et al. (1999). Onde o substrato é composto de óleo de oliva emulsionado com água destilada e goma arábica (7%) na proporção de 50:50. A reação enzimática é formada por 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,0) e 1 mL de solução enzimática. A temperatura da reação foi mantida a 37°C em banho termostático por 5 min sob agitação constante (82 rpm). A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de KOH 0,04 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera em 1µmol de ácido graxo por min de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (1U/mL=1µmoles/min), Equação (1).

$$\text{Atividade Lipolítica (U / mg)} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \quad \text{Eq. 1}$$

Preparo do creme com os biocatalisadores imobilizados

A preparação do creme puro se deu com o aquecimento dos componentes da fase oleosa e da fase aquosa separadamente a uma temperatura de 75°C, até a sua completa liquefação. Em seguida ambas as fases foram misturadas para a obtenção de um produto homogêneo, onde permaneceu no aquecimento por 10 min a uma temperatura de 75°C. O seu arrefecimento deu-se através da agitação manual. A adição do biocatalisador imobilizado em

diferentes proporções (0,25%; 0,5%; 0,75% e 1% p/p) no creme, bem como a composição do creme puro, está descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Preparação dos cremes utilizando as diferentes proporções de lipase de *Burkholderia cepacia* em óxido de magnésio com finalidade cosmética.

<u>Fase oleosa</u>	(%)	(%)	(%)	(%)
LBC MgO	0,25	0,5	0,75	1
Glicerina	2	2	2	2
Óleo de semente de girassol	1	1	1	1
Dimeticona	3	3	3	3
Etil hexilglicerina	1,5	1,5	1,5	1,5
Cetearth-33	2	2	2	2
Sorbitan Isostearate	2	2	2	2
Polysorbate 60	3	3	3	3
Goma xantana	1	1	1	1
Sorbitol	2,5	2,5	2,5	2,5
<u>Fase aquosa</u>				
Estearato de PEG-100	1	1	1	1
Limoneno	2	2	2	2
Geraniol	1	1	1	1
Phenoxyethanol	0,4	0,4	0,4	0,4
Alecrim (extrato da folha)	1	1	1	1
Acrilato de sódio	2	2	2	2
Álcool Benzílico	2	2	2	2
Água	72,35	72,1	71,85	71,6

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A invenção baseia-se nos seguintes resultados descritos abaixo para a elaboração do protocolo do creme utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em óxido de magnésio com intuito de remover os lipídios excessivos da pele e efetuar uma limpeza gradativa destas biomoléculas. O resultado baseou-se na determinação da atividade lipolítica e estabilidade térmica do biocatalisador imobilizado, e por fim a caracterização do creme com o biocatalisador imobilizado por meio da análise termogravimétrica (DTA/ TGA) e a determinação da composição química por FTIR.

Atividade Lipolítica

A escolha do método de imobilização utilizado foi realizada após testes feitos com os métodos de adsorção física e ligação covalente no carregamento de 0,3g/g de enzima-suporte, conforme estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa com outros tipos de suporte (CABRERA - PADILLA *et al.*, 2014).

O biocatalisador imobilizado, apresentou um rendimento de imobilização de cerca de 25% com atividade lipolítica de 298 U/g. Segundo HOU *et al.* (2013), no seu estudo de imobilização de laccase em titânio e nanopartículas funcionalizadas de titânio, os biocatalisadores imobilizados por ligação covalente que utilizam o glutaraldeído como agente reticulante e que apresentam uma atividade lipolítica baixa geralmente é por conta da redução da afinidade entre o sítio ativo da enzima e o substrato.

No estudo da aminólise dos ácidos linoleico e salicílico derivados da lipase comercial, já imobilizada de *Candida antarctica B* (CAL B), para aplicações na indústria cosmética, MOUAD *et al.* (2016), conseguiram um rendimento de imobilização de 96 a 99%, numa temperatura de 65°C em um meio livre de solventes. Demonstrando que a CAL B e sua atividade acilante apresenta alta eficiência catalítica para a implementação na produção de ingredientes cosméticos.

KUMAR *et al.* (2013), utilizaram como método de imobilização da lipase de *Bacillus sp.* o método de ligação covalente, tendo como suporte pellets de óxido de alumínio, obtendo um rendimento de imobilização das enzimas em torno de 78%.

WU *et al.* (2013), no seu estudo para observar a estabilidade da catalase imobilizada covalentemente em submicroesferas funcionalizadas de titânio, conseguiram obter uma atividade da catalase imobilizada de $1,85 \times 10^4$ U/mg de proteína e manter 65% da atividade inicial quando utilizado as submicroesferas de titânio como suporte.

Estabilidade Térmica

Na Figura 1 desta invenção pode-se observar que o biocatalisador imobilizado na temperatura de 37°C apresentou uma melhor estabilidade térmica quando comparado à temperatura de 60°C, apresentando uma atividade relativa aproximada de 100% no tempo de reação inicial, com uma atividade lipolítica de 281,87 U/g. Na temperatura de 60°C o biocatalisador imobilizado apresentou no tempo inicial uma atividade lipolítica de 219,75 U/g. Para a lipase de *Burkholderia cepacia* livre à temperatura de 37°C se manteve praticamente constante após 30 min de reação. Diferente da lipase de *Burkholderia cepacia* livre à temperatura de 60°C, que obteve um decaimento da sua atividade, corroborando com o resultado que tanto a enzima imobilizada quanto a enzima livre numa temperatura de 60°C, tem sua atividade lipolítica reduzida devido a desnaturação da mesma.

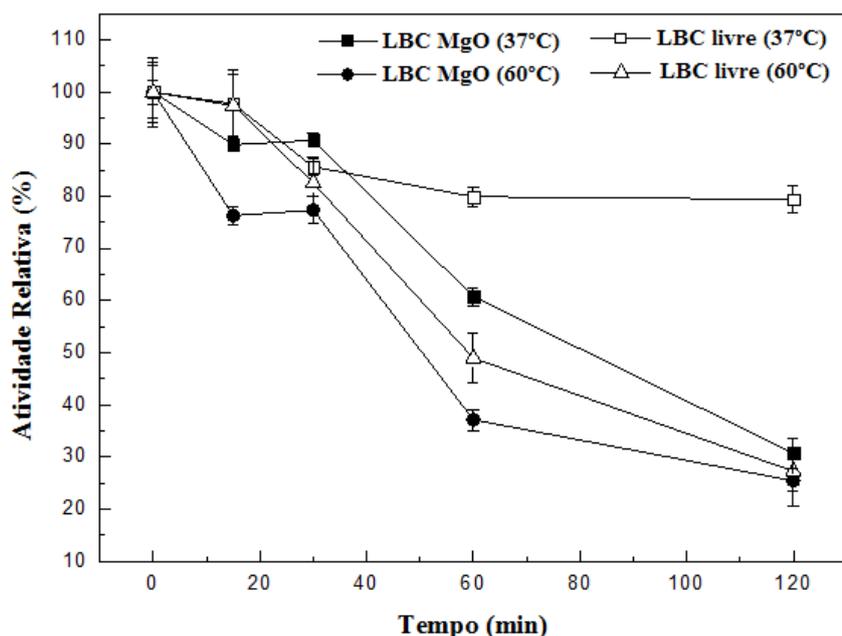


Figura 1: Estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada incubadas a 37°C ou 60°C.

Análise Termogravimétrica DTA/TGA

Nesta invenção baseando-se nas patentes e artigos descritos na literatura (PERAMAL *et al.*, 1997; XIE *et al.*, 2011) realizou-se a análise do DTA-TGA para a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC), MgO controle, LBC imobilizada em MgO por ligação covalente (LBC MgO), creme

sem a adição do biocatalisador imobilizado e os cremes com as diferentes proporções de biocatalisadores imobilizados, 0,25%, 0,5%, 075% e 1%.

No entanto na Figura 2a, para a lipase de *Burkholderia cepacia*, nota-se uma perda de massa inicial de 8% numa temperatura entre 40° e 100°C relativa a evaporação da água da superfície da enzima. E uma perda maior de 32% relativa à da decomposição dos grupos orgânicos e amino. Na Figura 2b, na temperatura entre 80° e 200°C pode-se notar um leve pico exotérmico referente à remoção de moléculas de água fisissorvida na superfície do suporte MgO. Entre as temperaturas de 320° e 422°C observa-se um pico endotérmico referente à perda de massa mais significativa, 11%, provavelmente devido à decomposição do hidróxido de magnésio com liberação de CO₂. Observando a Figura 2 c, numa temperatura entre 31° e 125°C, houve uma perda de massa considerável de 52% correspondente à evaporação da água da superfície do biocatalisador e da decomposição dos grupos orgânicos e amina, isto é, a enzima presente na superfície ou poros superficiais do suporte. Em seguida nota-se um pico endotérmico, numa temperatura entre 311° e 400°C, com perda de massa de 12% relativo à volatilização de alguns compostos orgânicos como: C, H, O e N adsorvidos na superfície das amostras (CHEN *et al.*, 2009).

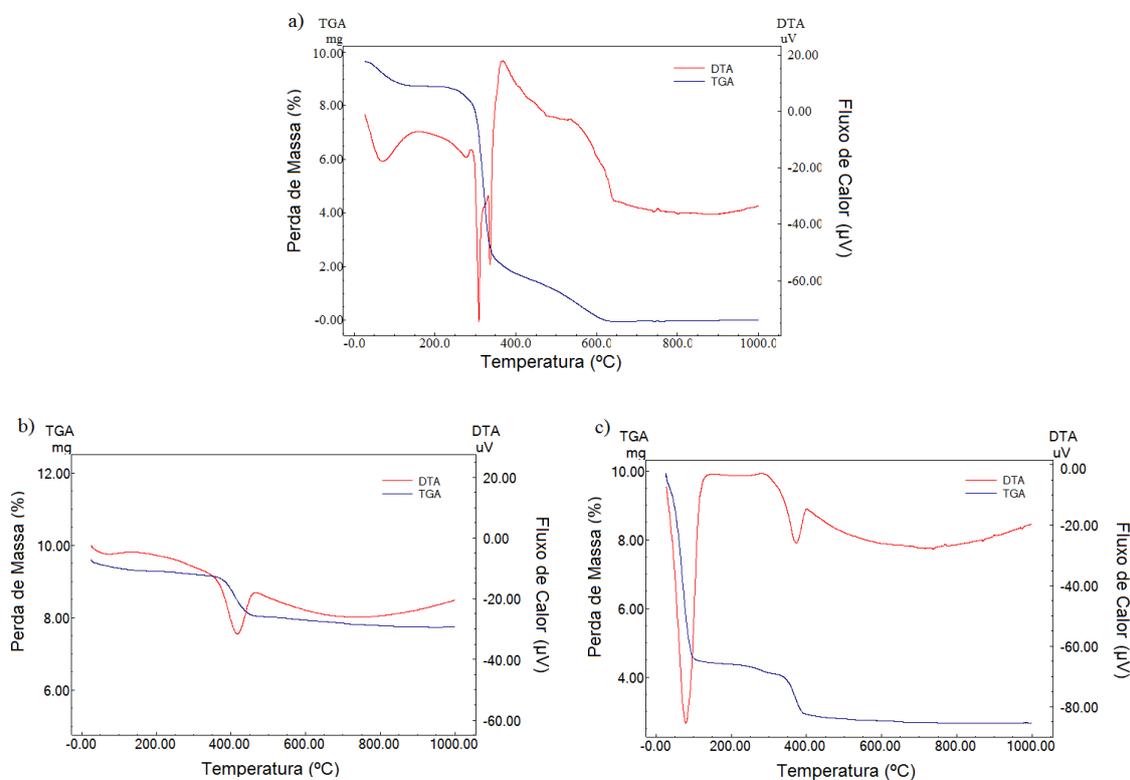


Figura 2: Análise Termogravimétrica a) lipase de *Burkholderia cepacia*, b) MgO controle e c) LBC MgO

Na análise termogravimétrica do creme puro, Figura 3 a), pode-se observar vários picos endotérmicos e exotérmicos de porte menor, com pequenas perdas de massa e um pico endotérmico maior, associado a uma relevante perda de massa de 55% numa temperatura de 100° a 200°C. De acordo com PERAMAL *et al.* (1997), a perda de massa equivale a evaporação da água contida na composição do creme, podendo esta se encontrar em equilíbrio dinâmico entre diferentes estados, enquanto o processo invasivo de aquecimento da amostra vai causar alterações na estrutura de creme que irá inevitavelmente alterar as gamas de temperaturas em que a água é libertada.

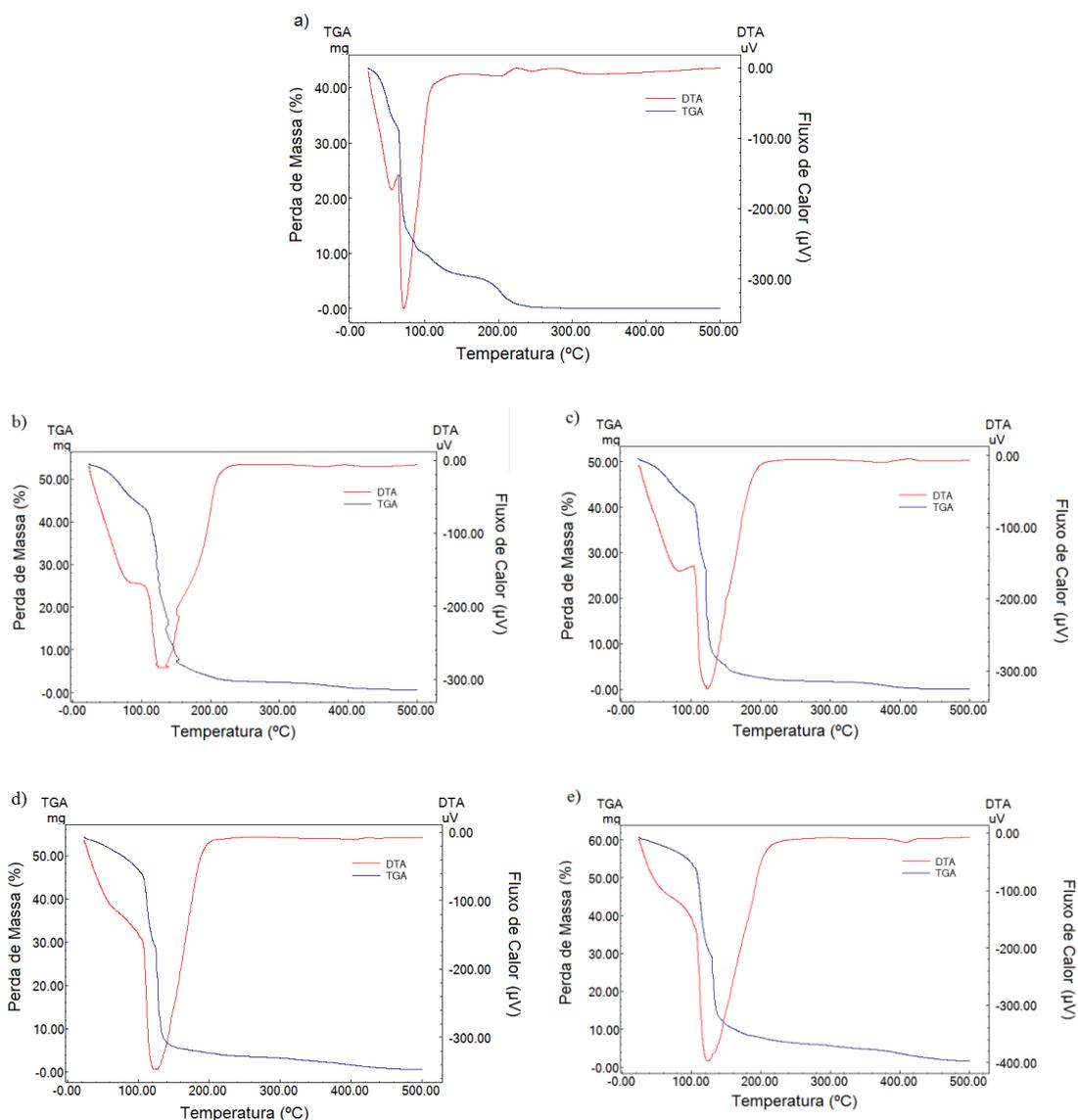


Figura 3: Análise Termogravimétrica do: a) creme puro e do creme com o biocatalisador imobilizado a uma proporção de: b) 0,25%, c) 0,5%, d) 0,75% e d) 1%.

O que pode-se observar comparando as análises da amostra de creme puro com as amostras do creme misturado ao biocatalisador imobilizado é que a temperatura de degradação das amostras contendo o biocatalisador é maior do que a do creme puro, significando dizer uma maior tolerância ao calor quando este for friccionado na pele.

Nota-se que os perfis apresentados para o creme com o biocatalisador imobilizado, demonstraram uma perda de massa equivalente à proporção de biocatalisador, como 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%, apresentaram, respectivamente, uma perda de massa de: 71%, 73%, 75% e 76%, na temperatura entre 100 e 200°C relativa à perda de água do creme e da decomposição dos grupos orgânicos e amino, isto é, a enzima presente na superfície ou poros superficiais do suporte (ALINEZHAD *et al.*, 2015). A partir da temperatura de 200°C houve uma redução drástica da perda de massa (0,6%), tornando-a praticamente constante para as análises do creme com o biocatalisador imobilizado inserido à proporção de 0,25, 0,5, 0,75 e 1% (Figura 3 b, c, d e e). Essas reduzidas perdas de massas equivalem à volatilização de alguns compostos orgânicos como: C, H, O e N adsorvidos na superfície das amostras, acordo com CHEN *et al.* (2009).

Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

A fim de complementar os resultados obtidos nesta invenção foi realizada a análise da composição das bandas características do objeto inventivo. A figura 4, apresenta a análise de FTIR da LBC livre, do MgO (controle), da LBC MgO, do creme (puro) e do creme com o biocatalisador imobilizado a uma proporção de: 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%. Na análise do MgO (controle), pode-se observar bandas específicas como a de 3461 cm^{-1} e 1490 cm^{-1} indicando a presença do grupamento hidroxil (OH), que é devido a umidade disponível na superfície do MgO. E outras duas bandas de adsorção, 1580 cm^{-1} e 1426 cm^{-1} correspondentes a vibrações simétricas e assimétricas de COO^- (XIE *et al.*, 2011). Para o espectro da LBC MgO, pode-se observar que foram mantidas as mesmas bandas do MgO (controle), apesar do processo químico para a imobilização, o suporte manteve suas características químicas.

Comparando os espectros da LBC livre e da LBC MgO, do creme com o biocatalisador imobilizado a uma proporção de: 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%, nota-se uma banda em 1030 cm^{-1} . Esta banda pode ser atribuída ao grupo amino e também pode estar associada a vibrações dos compostos da cadeia de proteína, como C-C e C-N (ANDRADE *et al.*, 2010). No espectro da

LBC livre são observados vestígios de proteína com bandas de absorção em 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , associados com o grupamento amina, em que os grupos amina primários e secundários são exibidos. Comparando-se as bandas do biocatalisador imobilizado (LBC MgO) com a LBC livre, é possível observar uma diminuição dos picos característicos no comprimento de onda entre 1100 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} , devido à liberação da lipase do suporte sólido. Isto provavelmente ocorre devido à interação do glutaraldeído com os grupos amina da enzima, o que resulta em bandas semelhantes às da enzima livre (HU *et al.*, 2012; PAULA *et al.*, 2008). Observando os espectros do creme juntamente com o biocatalisador imobilizado a uma proporção de: 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%, pode-se observar um aumento da banda em aproximadamente 4000 cm^{-1} , à medida que a quantidade de biocatalisador na amostra aumenta.

De acordo com Mcmurry (2013), as bandas correspondentes ao comprimento de onda de 2750 cm^{-1} à 3750 cm^{-1} , equivalentes ao creme puro e ao creme com as diferentes proporções de biocatalisadores imobilizados, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%, são referentes à compostos aromáticos, álcoois e aminas, que estão presentes na sua composição.

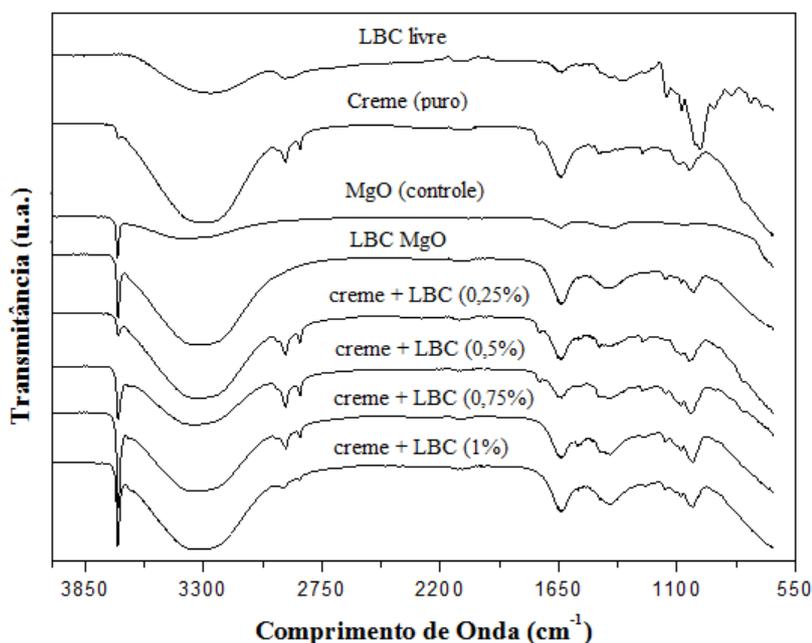


Figura 4: Análise de FTIR da LBC livre, do creme (puro), do MgO (controle), LBC MgO e do creme juntamente com o biocatalisador imobilizado a uma proporção de: 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%.

Referências Bibliográficas

- Alinezhad, H.; Tajbakhsh, M.; Ghobadi, N. Ionic liquid immobilized on Fe₃O₄ nanoparticles: a magnetically recyclable heterogeneous catalyst for one-pot three-component synthesis of 1,8-dioxodecahydroacridines. *Re. Chemical Intermed.* 2015.
- Andrade, L.H.; Rebelo, L.P.; Netto, C.G.C.M.; Toma, H.E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by diferente methodologies on supermagnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 66, p. 55-62, 2010.
- Berriatua, E.; Ziluaga, I.; Miguel-Virto, C.; Uribarren, P.; Juste, R.; Laevens, S.; Vandamme, P.; Govan, J. R. W. Outbreak of Subclinical Mastitis in a Flock of Dairy Sheep Associated with *Burkholderia cepacia* Complex Infection. *Journal of Clinical Microbiology.* 39, p. 990–994, 2001.
- Cabrera-Padilla, R. Y.; Melo, E. B.; Pereira, M. M.; Figueiredo, R. T.; Fricks, A. T.; Franceschi, E.; Lima, A. S.; Silva, D. P.; Soares, C. M. F. Use of ionic liquids as additives for the immobilization of lipase from *Bacillus sp.* *Journal of Chemycal Technology.* 2014.
- Chen, Y. Z.; Ching, C. B.; Xu, R. Lipase immobilization on modified zirconia nanoparticles: Studies on the effects of modifiers. *Process Biochemistry.* 44, p. 1245 – 1251, 2009.
- Costa, V. E.U.; Amorim, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova,* 22, 1999.
- Dhake, K. P.; Karoyo, A. H.; Mohamed, H. M.; Wilson, L. D.; Bhanage, B. M. Enzymatic activity studies of *Pseudomonas cepacia* lipase adsorbed onto copolymer supports containing β-cyclodextrin. *Journal os Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 87, p. 105 – 112, 2013.
- Girelli, A.M.; Mattei, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B.* 819, 1, p. 3-16, 2005.
- Gupta, S.; Bhattacharya, A.; Murthy, C.N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology.* 2, p. 171-190, 2013.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances.* 27, p. 782-798, 2009.
- Hou, J.; Dong, G.; Ye, Y.; Chen, V. Laccase Immobilization on Titania Nanoparticles and Titania-functionalized Membranes. *Journal of Membrane Science.* 2013.
- Hu, Y.; Tang, S.; Jiang, L.; Zou, B.; Yang, J.; Huan, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry.* 47, 2291–2299, 2012.

Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*. p. 315-351, 1999.

Khan, N. R.; Rathod, V.K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. *Process Biochemistry*, p.1-74, 2015.

Kjellander, M.; Mazari, A. M. A.; Boman, M.; Mannervik, B.; Johansson, G. Glutathione transferases immobilized on nanoporous alumina: Flow system kinetics, screening and stability. *Analytical Biochemistry*. 2013.

Kumar, D.; Nagar, S.; Bhushanc, I.; Kumar, L.; Parshad, R.; Gupta, V. K. Covalent Immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 87, p. 51–61, 2013.

Mcmurry, J. *Química Orgânica*. São Paulo, v. 1, p. 398-407, 2 ed. 2013.

Mouad, A. M.; Taupin, D.; Lehr, L.; Yvergnaux, F.; Porto, A. L. M. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. p.1-19, 2016.

Paula, A. V.; Moreira, A. B. R.; Braga, L. P.; Castro, H. F.; Bruno, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Química Nova*. 31, 35-40, 2008.

Peramal, V.L.; Tamburic, S.; Craig, D.Q.M. Characterisation of the variation in the physical properties of commercial creams using thermogravimetric analysis and rheology. *International Journal of Pharmaceutics*. 155, p. 91–98, 1997.

Rahman, M. B. A.; Zaidan, U. H.; Basri, M.; Hussein, M. Z.; Rahman, R. N. Z. R. A. Salleh, A. B. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugosa* immobilised on Mg, Zn and NiO layered double hydroxides (LDHs). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 50, p. 33–39, 2008.

Sekizawa, K.; Widjaja, H.; Maeda, S.; Ozawa, Y.; Eguchi, K. Low temperature oxidation of methane over Pd catalyst supported on metal oxides. *Catalysis Today*. 59, 69-74, 2000.

Shang, C.-Y.; Li, W.-X.; Zhang, R.-F. Immobilized *Candida antarctica* lipase B on ZnO nanowires/macroporous silica composites for catalyzing chiral resolution of (R,S)-2-octanol. *Enzyme and Microbial Technology*. 61, 28–34, 2014.

Soares, C. M. F. Otimização por Planejamento Experimental da Imobilização de Lipase em Sílica de Porosidade Controlada na Presença de Estabilizantes. *Dissertação de Mestrado*, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2000.

Thakuria, H.; Borah, B.M.; Das, G. Macroporous metal oxides as an efficient heterogeneous catalyst for various organic transformations—A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 274, p. 1–10, 2007.

Wu, H.; Liang, Y.; Shi, J.; Wang, X.; Yang, D.; Jiang, Z. Enhanced stability of catalase covalently immobilized on functionalized titania submicrospheres. *Materials Science and Engineering C*. 33, p. 1438-1445, 2013.

Xie, S.; Han, X.; Kuang, Q.; Zhao, Y.; Xie, Z.; Zheng, L. Intense and wavelength-tunable photoluminescence from surface functionalized MgO nanocrystal clusters. *Journal of Materials Chemistry*. 21, p. 7263–7268, 2011.

Patentes

Arne Agerlin Olsen. Polypeptides conjugated with polymers. Int US 6.303.752 B1.16 oct 2001. United States Patente, Bagsvaerd (DK).

Kazuma Yoshizumi. Lipase inhibitant. Int JP 2001398511. 09 jul 2003. Japan Patent Office. Japan.

Howard Fein. Selective enzyme treatment of skin conditions. Int US20030026794. 6 feb 2006. United States Patente Publication. United States of America.

Zdenek Kratky. Preparation of cheese flavorant. Int US 5.788.972. 18 may 1993. United States Patente. Switzerland.

Luíz c. Calvo. Immobilized enzymes. Int US 4.556.554. 3 dez 1985. United States Patent. United States of America.

Armelle de Salvert. Product for topical application containing a lipase and an active ingredient precursor. Int US 5.788.972. 4 aug 1998. United States Patent. France.

REINVIDICAÇÕES

1. Preparo do biocatalisador imobilizado utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* a partir da técnica de ligação covalente no óxido metálico MgO.
2. Composição cosmética caracterizada pelo fato de que compreende:
 - pelo menos um tipo de biocatalisador imobilizado compreendendo de 0,25% a 1% (p/p) de biocatalisador imobilizado em MgO por ligação covalente, podendo ser utilizado em diferentes proporções no creme com finalidade cosmética;
 - pelo menos uma porção oleosa contendo o biocatalisador imobilizado; e
 - uma porção aquosa.
3. Composição cosmética de acordo com a reivindicação 1 a 2, caracterizada pelo fato de que o biocatalisador imobilizado está presente em uma quantidade que varia de 0,25% a 1% em massa, com base na massa total da composição.
4. Composição cosmética de acordo com a reivindicação 2 a 3, caracterizada pelo fato de que o creme cosmético com o biocatalisador imobilizado possui a função de desobstrução da seborréia dos poros da pele.
5. Composição cosmética de acordo com a reivindicação 1 a 4, caracterizada também para o uso do óxido de magnésio afim de propiciar a liberação gradativa da enzima e ação esfoliante, quando friccionado sobre a pele.
6. Uso da composição cosmética como definida em qualquer uma das reivindicações 2 a 5, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um creme com lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por ligação covalente em óxido metálico MgO para limpeza e higienização da pele.

Capítulo V

CONCLUSÕES

Por serem considerados uma boa alternativa para a imobilização da lipase, os suportes hidrofóbicos, no estudo em questão, os óxidos metálicos (ZnO e Al_2O_3) modificados pelos líquidos iônicos próticos (LIPs): Methyl-Monoethanolamine Acetate (2mHEAA); Monoethanolamine Acetate (2HEAA) and Diethanolamine Acetate (BHEAA) foram base para o presente estudo. No qual apresentaram melhores resultados como maior atividade lipolítica e rendimento de imobilização, melhor estabilidade térmica e operacional e modificação da superfície do suporte, em relação aos biocatalisadores na ausência dos LIPs.

Os óxidos metálicos modificados com os três tipos de LIPs e o potencial destes biocatalisadores imobilizados foram analisados a partir da avaliação da estabilidade e das caracterizações físico-químicas. Verificando-se que o óxido de alumínio, no caso a BCL Al_2O_3 (2mHEAA) apresentou melhores resultados com relação ao rendimento de imobilização que a o óxido de zinco, no caso a BCL ZnO (BHEAA), devido provavelmente a uma maior área superficial do óxido de alumínio, cerca de 15 vezes maior, que a área superficial do óxido de zinco, possibilitando uma superfície de contato maior entre o suporte e a enzima para a ocorrência da imobilização. Os biocatalisadores modificados com os LIPs apresentaram maior estabilidade térmica e operacional em comparação ao suporte controle. Para a BCL Al_2O_3 (2mHEAA) e a BCL ZnO (BHEAA) apresentaram melhor estabilidade a uma temperatura de 37°C . Já a melhor estabilidade operacional foi demonstrada para a BCL Al_2O_3 (2mHEAA) e a BCL ZnO (BHEAA) ambas com 4 ciclos de reusos. O baixo número de reusos, pode ter sido um efeito combinado de desativação/dessorção da lipase e de repetidas operações de manipulação.

Na caracterização físico-química e morfológica dos biocatalisadores imobilizados observou-se na análise dos difratogramas do DRX, que os biocatalisadores do ZnO possuíam picos mais intensos, com distâncias interplanares mais estreitas, comprovando a cristalinidade do material, em relação aos biocatalisadores do Al_2O_3 , que apresentaram uma estrutura mais

amorfa, isto é, diferentes tamanhos de cristais, devido aos picos mais largos e com distâncias interplanares grandes, isto pode ter proporcionado uma maior interação entre a enzima e o suporte, possibilitando um maior rendimento de imobilização como explicitado anteriormente. Na análise do MEV, observou-se que os biocatalisadores imobilizados apresentaram um aumento da porosidade e uma superfície mais uniforme e cristalina do que no suporte controle, demonstrando assim a existência da enzima imobilizada, confirmada no rendimento de imobilização. Os biocatalisadores que obtiveram melhores resultados, ZnO (BHEAA) e Al₂O₃ (2mHEAA), apresentaram uma área superficial menor do que os outros, devido ao preenchimento dos poros pelas enzimas. Possivelmente a melhoria da atividade deveu-se a uma maior interação desses LIPs com o suporte e conseqüentemente com as enzimas.

O biocatalisador produzido com o MgO com finalidade cosmética no intuito de remover os lipídios excessivos da pele e efetuar uma limpeza gradativa destas biomoléculas, apresentou segundo análises termogravimétricas, uma tolerância significativa ao calor, qualidade importante quando este for friccionado na pele. A imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em óxido de magnésio, possibilita a indústria cosmetológica a trabalhar com um material não tóxico que permite a ação gradual da enzima.

O presente trabalho mostra a importância da pesquisa sobre o comportamento dos óxidos metálicos ZnO e Al₂O₃ modificados com líquidos iônicos próticos, ainda não testados na literatura para a imobilização de enzimas. Bem como a utilização de biocatalisadores imobilizados em MgO, na indústria cosmética como creme para tratamento de peles acnéicas.

Capítulo VI

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Modificação de outros tipos de suportes metálicos com diferentes líquidos iônicos próticos;
- Imobilização dos suportes metálicos (Al_2O_3 e ZnO) com outros tipos de lipases;
- Avaliar o potencial catalítico dos Bis em reação de hidrólise, esterificação e transesterificação;
- Utilizar os Bis em processos não convencionais (meio pressurizado, ultrassom, entre outros)
- Avaliar o potencial do BI em MgO com aplicações cosméticas.

Capítulo VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilization and application of lipases in organic media. *Chemical Society Revist*, 42, p. 6406, 2013.
- AKÇAY, A.; BABUCCI, M.; BALCI, V., UZUN, A. A model to predict maximum tolerable temperatures of metal-oxide-supported 1-n-butyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Chemical Engineering Science*. 123, p. 588-595, 2015.
- ALVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid phase equilibria*. 299, p. 42-50, 2010.
- AL-HAZMI, F.; ALNOWAISER, F.; AL-GHAMDI, A.A.; AL-GHAMDI, A.A.; ALY, M.M.; AL-TUWIRQI, R.M.; EL-TANTAWY, F. A new large – Scale synthesis of magnesium oxide nanowires: Structural and antibacterial properties. *Superlattices and Microstructures*. 52, p. 200–209, 2012.
- ANOUTI, M.; JACQUEMIN, J.; LEMORDANT, D. Transport properties of protic ionic liquids, pure and in aqueous solutions: Effects of the anion and cation structure. *Fluid Phase Equilibria*, v. 297, p. 13–22, 2010.
- ANSARI, S.A.; HUSAIN, Q. Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β galactosidase on cocanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles – Its future aspects in biosensor applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 70, p. 119–126, 2011
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*. 30, p. 512–523, 2012.
- ANTHONSEN T, FESSNER WD. Modern biocatalysis – stereoselective and environmentally friendly reactions. Weinheim, Germany: *Wiley-VCH*. 2009.
- ARYA, S. K.; SAHA, S.; RAMIREZ-VICK, J. E.; GUPTA, V.; BHANSALI, S.; SINGH, S. P. Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: Review. *Analytica Chimica Acta*, 737, p. 1–21, 2012.
- BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; MIGUEL-VIRTO, C.; URIBARREN, P.; JUSTE, R.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W. Outbreak of Subclinical Mastitis in a Flock of Dairy Sheep Associated with *Burkholderia cepacia* Complex Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, p. 990–994, 2001.
- BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology*. 26, p. 566–572, 2008.

- BÓDALO, A.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M.F.; MONTIEL, M.C.; GÓMEZ, M.; MURCIA, M.D. Production of ricinoleic acid estolide with free and immobilized lipase from *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal*. 39, p. 450–456, 2008.
- BOLIVAR, J. M.; CONSOLATI, T.; MAYR, T.; NIDETZKI, B. Shine a light on immobilized enzymes: real-time sensing in solid supported biocatalysts. *Trends in Biotechnology*. 31, n. 3, 2013.
- BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL, B. R. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. 2004.
- CAO, L.Q., VAN LANGEN, L.; SHELDON, R.A., Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free. *Current Opinion in Biotechnology*. 14, 4, p. 387-394, 2003.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*. 32, p. 175-187, 2009.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*. p. 1-11, 2015.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*. 27, p. 146-156, 2004.
- CHAURASIA, S. K.; SINGH, R. K.; CHANDRA, S. Structural and transport studies on polymeric membranes of PEO containing ionic liquid, EMIM-TY: Evidence of complexation. *Solid State Ionic*. 183, p. 32 – 39, 2011.
- CHEN, Y. Z.; CHING, C. B.; XU, R. Lipase immobilization on modified zirconia nanoparticles: Studies on the effects of modifiers. *Process Biochemistry*. 44, p. 1245 – 1251, 2009.
- COSTA, V. E.U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, n. 22, 1999.
- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química nova*. 23, p. 531-537, 2000.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V.; Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*. 27, 4, p. 623-630, 2004.
- DA RÓS, P.C.M.; SILVA, G.A.M.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 101, p. 5508-5516, 2010.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support material. *Biotechnology*. 3, p. 1–9, 2013.

- DE LATHOUDER, K.M.; BAKKER, J.J.W.; KREUTZER, M.T.; WALLIN, S.A.; KAPTEIJN, F.; MOULIJN, J.A. Structured Reactors for Enzyme Immobilization: A Monolithic Stirrer Reactor for Application in Organic Media. May 2006, *International Conference on Sustainable (Bio) Chemical Process Technology*. 84, n. 5, p. 390–398, 2006.
- DHAKE, K. P.; KAROYO, A. H.; MOHAMED, H. M.; WILSON, L. D.; BHANAGE, B. M. Enzymatic activity studies of *Pseudomonas cepacia* lipase adsorbed onto copolymer supports containing β -cyclodextrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 87, p. 105 – 112, 2013.
- DIAZ, J. F.; BALKUS Jr, K. J. Enzyme immobilization in MCM-4 1 molecular sieve. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2, p. 115 – 126, 1996.
- ENDRES, F.; Ionic Liquids: Promising Solvents for Electrochemistry. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 218, p. 255–283, 2004.
- FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. Berlin: SpringerVerlag; 1997.
- FAUZI, A. H. M.; AMIM, N. A. S. An overview of ionic liquid as solvents in biodiesel synthesis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16, p. 5770 – 5786, 2012.
- FIGUEIREDO, J. L., RIBEIRO, F. R., *Catálise Heterogênea*, 1^a ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1989.
- FIERRO, J. L. G.; PEÑA, M. A. Supported metals in the production of hydrogen: Supported metals in catalysis. *Imperial College Press*. 7, 2005.
- FRENCH, R.H.; MULLEJANS, H.; JONES, D.J. Optical properties of aluminum oxide: determined from vacuum ultraviolet and electron energy-loss spectroscopies. *Journal Ceramic*. 81, p. 2549-57, 1998.
- GANDHI, N. N. “Applications of lipase”. *Journal of the American Oil Chemist Society*, 74, n. 6, p. 621–634, 1997.
- GAO, W.-W.; ZHANG, F.-X.; ZHANG, G.-X.; ZHOU, C.-H. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis – Review. *Biochemical Engineering Journal*. 99, p. 67-84, 2015.
- GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Chromatography B*. 819, n. 1, p. 3-16, 2005.
- GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C.N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 2, p. 171-190, 2013.
- GUTMANN, T.; GRUNBERG, A.; ROTHERMEL, N.; WERNER, M.; SROUR, M.; ABDULHUSSAIN, S.; TAN, S.; XU, Y.; BREITZKE, H.; BUNTKOWSKY, G. Solid-

state NMR concepts for the investigation of supported transition metal catalysts and nanoparticles. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 2013.

- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. *Chemical Society Review*. 38, p. 453–468, 2009.
- HARA, P.; MIKKOLA, J.-P.; YU, D.; MURZIN, T. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric Acylation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 67, p. 129–134, 2010.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 27, p. 782–798, 2009.
- HOU, J.; DONG, G.; YE, Y.; CHEN, V. Laccase Immobilization on Titania Nanoparticles and Titania-functionalized Membranes. *Journal of Membrane Science*. 2013.
- HOWARD FEIN. Selective enzyme treatment of skin conditions. Int US20030026794. 6 feb 2006. United States Patente Publication. United States of America.
- HU, Z.; XU, L.; WEN, X. Mesoporous silicas synthesis and application for lignin peroxidase immobilization by covalent binding method. *Journal of Environmental Sciences*. 25, p. 181–187, 2012.
- HU, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUAN, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*. 47, p. 2291–2299, 2012.
- HUSAIN, Q.; ANSARI, S. A. F. A.; AZAM, A. Immobilization of *Aspergillusoryzae* _ galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*. 49, p. 37–43, 2011.
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*. p. 315–351, 1999.
- JALADI, H.; KATIYAR, A.; THIEL, S. W.; GULIANTS, V. V.; PINTO, N. G. Effect of pore diffusional resistance on biocatalytic activity of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SBA – 15 hosts. *Chemical Engineering Science*. 64, p. 1474–1479, 2009.
- JANI, A.M.M.; LOSIC, D.; VOELCKER, N.H. Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications. *Progress in Materials Science*. 58, p. 636–704, 2013.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process biochemistry*. 47, p. 555–569, 2012.
- KHOABI, M.; MOTEVALIZADEH, S.F.; ASAGDOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, A.; FARAMARZI, M.A. Polyethyleimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. *Materials Chemistry and Physics*. 149, p. 77–86, 2015.

- KIM, M. S.; KIM, D. Y.; CHO, M. Y.; NAM, G.; KIM, K.; LEE, D.-Y.; KIM, S.- O; LEEM, J.-Y. Effects of buffer layer thickness on properties of ZnO thin films grown on porous silicon by plasma – assisted molecular beam epitaxy. *Vacuum*. 86, p. 1373 – 1379, 2012.
- KJELLANDER, M.; MAZARI, A. M. A.; BOMAN, M.; MANNERVIK, B.; JOHANSSON, G. Glutathione transferases immobilized on nanoporous alumina: Flow system kinetics, screening and stability. *Analytical Biochemistry*. 2013.
- KNEŽEVIĆ, Z.D.; ŠILER-MARINKOVIĆ, S. S.; MOJOVIĆ, L. V. Immobilized lipases as practical catalysts. *APTEFF*. 35, p. 151-164, 2004.
- KUMAR, D.; NAGAR, S.; BHUSHANC, I.; KUMAR, L.; PARSHAD, R.; GUPTA, V. K. Covalent Immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 87, p. 51-61, 2013.
- LEE, C.-H.; LIN, T.-S.; MOU, C.-Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *NanoToday*. 4, p. 165–179, 2009.
- LEE, S. H.; LEE, H. J.; SHIKU, H.; YAO, T.; MATSUE, T. A facile method for patterned growth of ZnO nanowires using a black ink. *Electronic materials letters*. 8, p. 511-513, 2012.
- LUANGON, B.; SIYASUKH, A.; WINAYANUWATTIKUN, P.; TANTHAPANICHAKOON, W.; TONANON, N. Flow-through immobilization of *Candida rugosa* lipase on hierarchical micro-/macroporous carbon monolith. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 75, p. 80– 85, 2012.
- LUCKARIFT, H. R.; SPAIN, J. C.; NAIK, R. R.; STONE, M. O. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology*. 22, p. 211-213, 2004.
- MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous Mesoporous Mater*. 118, p. 334-340, 2009.
- MAHMOOD, I.; GUO, C.; XIA, H.S.; MA, J.H.; JIANG, Y.Y.; LIU, H.Z. Lipase immobilization on oleic acid-pluronic (l-64) block copolymer coated magnetic nanoparticles, for hydrolysis at the oil/water interface. *Industrial and Engeneering Chemistry*. 47, p. 6379–85, 2008.
- MAHENTHIRALINGAM, E., T. A. URBAN, AND J. B. GOLDBERG. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology*. 3, p.144–156, 2005.
- MALEK, M. F.; MAMAT, M. H.; MUSA, M. Z.; KHUSAIMI, Z.; SAHDAN, M. Z.; SURIANI, A.B; ISHAK, A.; SAURDI, I.; RAHMAN, S. A.; RUSOP, M. Thermal annealing-induced formation of ZnO nanoparticles: Minimum strain and stress

- ameliorate preferred c-axis orientation and crystal-growth properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 610, p. 575-588, 2014.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, p. 1451–1463, 2007.
- MAXIMO, G.J.; SANTOS, R.J.B.N.; LOPES-DA-SILVA, J.A.; COSTA, M.C.; MEIRELLES, A.J.A.; COUTINHO, J.A.P. Lipidic Protic Ionic Liquid Crystals. *ACS Sustainable Chemical Engineering*. dx.doi.org/10.1021/sc400365h, 2013.
- MCMURRY, J. Química Orgânica. 7ª ed., Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.: Rio de Janeiro, vol. 1, 2013.
- MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*. 28, 2, p. 296-305, 2005.
- 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*. 34, 5, p. 831 – 840, 2011.
- MITCHELL, S.; PEREZ-RAMIREZ, J. Mesoporous zeolites as enzyme carriers: Synthesis, characterization, and application in biocatalysis. *Catalysis Today*. 168, p. 28–37, 2011.
- MILETIC, N.; NASTASOVIC, A. LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. 115, p. 126–135, 2012.
- MILETIC, N.; VUKOVI, Z.; NASTASOVI, A.; LOOKS, K. Macroporous poly (glycidylmethacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56, p. 196-201, 2009.
- NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; GUPTA, V. K. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. *Process Biochemistry*. 47, p. 1402-1410, 2012.
- NOINVILLE, S.; REVAULT, M.; BARON, M.H. Conformational changes of enzymes adsorbed at liquid-solid interface: relevance to enzymatic activity. *Biopolymers*. 67, p. 323-326, 2002.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química Nova*. 29, n. 1, 2006.
- PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de candida rugosa imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Química Nova*. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

- PARK, M.; PARK, S. S. SELVARAJ, M.; ZHAO, D.; HA, C-S. Hydrophobic mesoporous materials for immobilization of enzymes. *Microporous and Mesoporous Materials*. 124, p. 76-83, 2009.
- POPAT, K. C.; MOR, G.C.; DESAI, T. A. Surface Modification of Nanoporous Alumina Surfaces with Poly(ethylene glycol). *Langmuir*. 20, p. 8035-8041, 2004.
- QUIRÓS, M.; GARCÍA, A.B.; MONTES-MORAN, M.A. Influence of the support surface properties on the protein loading and activity of lipase/mesoporous carbon biocatalysts. *Carbon*. 49, p. 406-415, 2011.
- RAHMAN, M. B. A.; ZAIDAN, U. H.; BASRI, M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A. SALLEH, A. B. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugose* immobilised on Mg, Zn and NiO layered double hydroxides (LDHs). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 50, p. 33–39, 2008.
- RAMANI, K.; BOOPATHY, R.; VIDYA, C.; KENNEDY, L.J.; VELAN, M.; SEKARAN, G. Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil. *Process Biochemistry*. 45, p. 986–992, 2010.
- REETZ, M. T.; JAEGER, K.-E.; Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chemistry and Physics of lipids*. 93, p. 3-14, 1998.
- RODRIGUES, R. C.; BOLIVAR, J. M.; PALAU-ORS, A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 44, p. 386–393, 2009.
- SALAS, G.; COSTO, R.; MORALES, M. P. Synthesis of Inorganic Nanoparticles. *Frontiers of Nanoscience*. 4, p. 35-79, 2012.
- SANTALLA, E.; SERRA, E.; MAYORAL, A.; LOSADA, J.; BLANCO, R. M.; DIAZ, I. In-situ immobilization of enzymes in mesoporous sílicas. *Solid State Sciences*. 13, p. 691-697, 2011.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*. 30, p. 489–511, 2012
- SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*. 5, p. 187-202, 1997.
- SHANG, C.-Y.; LI, W.-X.; ZHANG, R.-F. Immobilized *Candida antarctica* lipase B on ZnO nanowires/macroporous silica composites for catalyzing chiral resolution of (R,S)-2-octanol. *Enzyme and Microbial Technology*. 61, p. 28–34, 2014.

- SEKIZAWA, K.; WIDJAJA, H.; MAEDA, S.; OZAWA, Y.; EGUCHI, K. Low temperature oxidation of methane over Pd catalyst supported on metal oxides. *Catalysis Today*. 59, p. 69-74, 2000.
- SHAMEL, M.M.; RAMACHANDRAN, K.B.; HASAN, M.; AL-ZUHAIIR, S. Hydrolysis of palm and olive oils by immobilized lipase using hollow-fibre reactor. *Engineering Journal*. 34-3, p. 228–235, 2007.
- SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. - Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. *Biotechnology*. 10, p. 23-40, 2011.
- SILVA, A.L.P.; SOUSA, K.S.; GERMANO, A.F.S.; OLIVEIRA, V.V.; ESPÍNOLA, J.G.P.; FONSECA, M.G.; ARAKAKI, C.A.; ARAKAKI, T.L.N.H. A new organofunctionalized silica containing thioglycolic acid incorporated for divalent cations removal—A thermodynamic/basic center interaction. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 332, p. 144–149, 2009.
- SILVA, S. S.; MAGALHÃES, F.; SANSIVIERO, M. T. Nanocompósitos semicondutores ZnO/TiO₂: Testes fotocátlicos. *Química Nova*. 33, p. 85-89, 2010.
- SILVA, J.A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.S.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*. 60, p. 16– 24, 2012.
- SOARES, C. M. F. Otimização por Planejamento Experimental da Imobilização de Lipase em Sílica de Porosidade Controlada na Presença de Estabilizantes. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP. Brasil, 2000.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. P.; CONCEIÇÃO, T. G. C.; CARVALHO, N. B.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A.; FREITAS, L. S.; SILVA, S. M.; DURO, M. A. I.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Production of ethyl esters and emulsifiers using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase with protic ionic liquid as additives. *Enzyme and Microbial Technology*, in Press. 2013.
- SPERANZA, P.; MACEDO, G.A. Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties -Review. *Process Biochemistry*. 47, p.1699-1706, 2012.
- TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 93, p. 8-19, 2012.
- THAKURIA, H.; BORAH, B.M.; DAS, G. Macroporous metal oxides as an efficient heterogeneous catalyst for various organic transformations—A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 274, p. 1–10, 2007.
- TRECCANI, L.; KLEIN, T. Y.; MEDER, F.; PARDUN, K.; REZWAN, K. Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomaterialia*. 9, p. 7115–7150, 2013.

- TSAY, C. – Y.; LEE, W. – C. Effect of dopants on the structural, optical and electrical properties of sol-gel derived ZnO semiconductor thin films. *Current applied Physics*. 13, p. 60-65, 2013.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Tibitech*. 15, 1997.
- VIRTANEN, P.; KARHU, H.; KORDAS, K.; MIKKOLA, J.-P. The effect of ionic liquid in supported ionic liquid catalysts (SILCA) in the hydrogenation of α , β -unsaturated aldehydes. *Chemical Engineering Science*. 62, p. 3660–3671, 2007.
- YE, P.; JIANG, J.; XU, Z.-K. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 60, p. 62-67, 2007.
- WANG, L.; WANG, J.; ZHANG, S.; SUN, Y. ZHU, X.; CAO, Y.; WANG, X.; ZHANG, H.; SONG, D. Surface plasmon resonance biosensor based on water-soluble ZnO–Au nanocomposites. *Analytica Chimica Acta*. 653, p. 109–115, 2009.
- WANG, J.-Y.; MA, C.-L.; BAO, Y.-M.; XU, P.-S. Lipase entrapment in protamine-induced bio-zirconia particles: Characterization and application to the resolution of (R,S)-1-phenylethanol. *Enzyme and Microbial Technology*. 51, p. 40–46, 2012.
- WEI, S.; ZHANG, Y.-L.; DING, H.; LIU, J.; SUN, J.; HE, Y.; LI, Z.; XIAO, F.-S. Solvothermal fabrication of adsorptive polymer monolith with large nanopores towards biomolecules immobilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engeneer Aspects*. 380, p. 29–34, 2011.
- WU, Y.; WANG, Y.; GUANGSHENG, L.; DAI, Y. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄ – chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. *Bioresource Technology*. 100, p 3459–3464, 2009.
- WU, H.; LIANG, Y.; SHI, J.; WANG, X.; YANG, D.; JIANG, Z. Enhanced stability of catalase covalently immobilized on functionalized titaniasubmicrospheres. *Materials Science and Engineering*. 33, p. 1438–1445, 2013.
- ZARCULA, C.; CROITORU, R.; CORÎCI, L.; CSUNDERLIK, C.; PETER, F. Improvement of Lipase Catalytic Properties by Immobilization in Hybrid Matrices. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 52, 2009.
- ZHAO, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85, 891–907, 2010.
- ZHENG, L.; ZHANG, S.; ZHAO, L.; ZHU, G.; YANG, X.; GAO, G.; CAO, S. Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 38, p. 119–125, 2006.
- ZHOU, J.; YANG, S.; YU, J. Facile fabrication of mesoporous MgO microspheres and their enhanced adsorption performance for phosphate from aqueous solutions. *Colloids and Surfaces. Physicochem. Eng. Aspects*. 379, p. 102–108, 2011.

ZHOU, J.; LU, M.; YANG, W.; CEN. Thermogravimetric analysis of the hydrolysis of zinc particles. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, p. 2617-2621, 2010.

ZHU, Y. – T.; REN, X. – Y.; LIU, Y. – M.; WEI, Y.; QING, L. – S.; LIAO, X. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: Characterization and application for enzymatic inhibition assays. *Materials Science and Engineering*. 38, p.278-285, 2014.



