

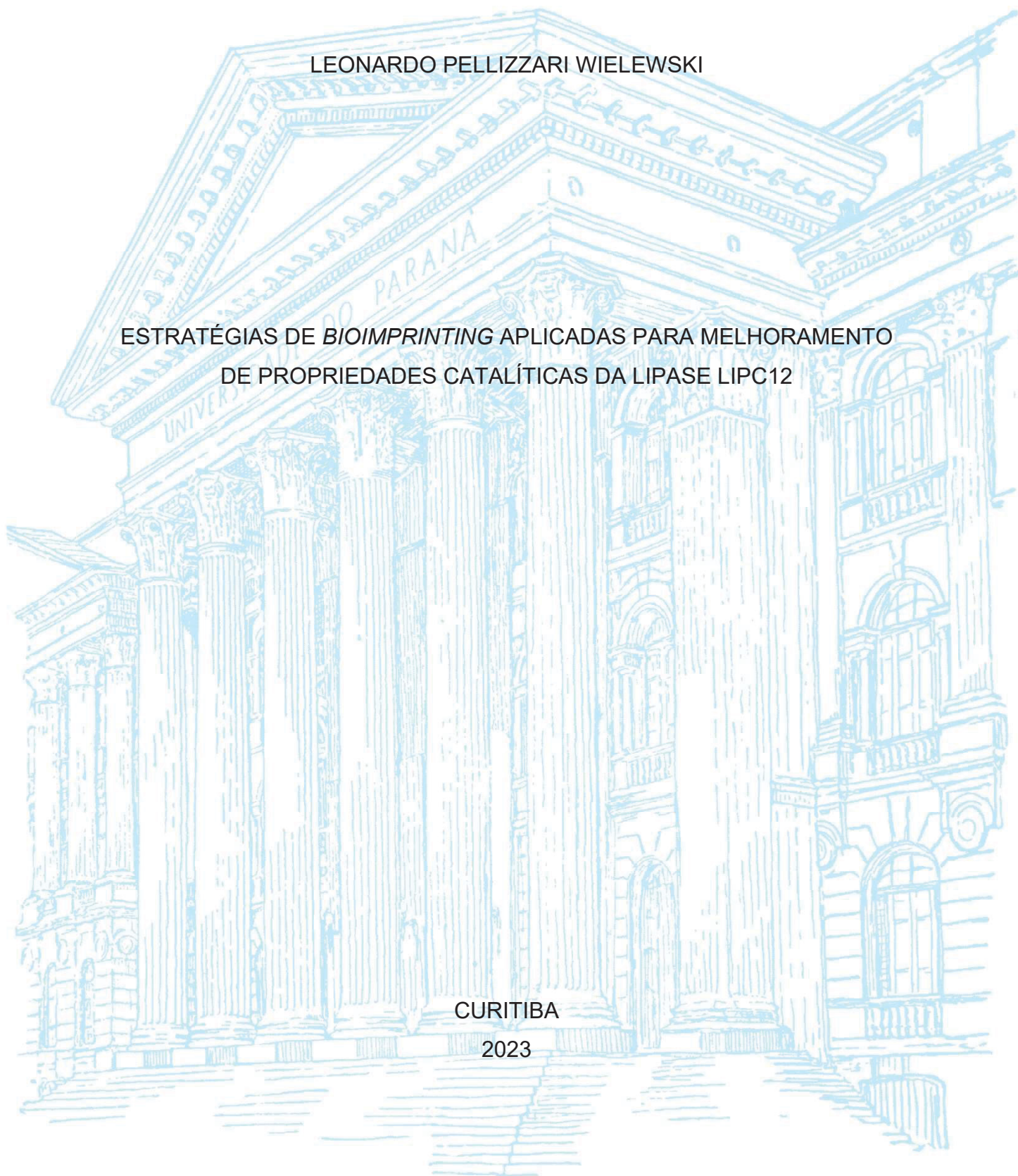
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI

ESTRATÉGIAS DE *BIOIMPRINTING* APLICADAS PARA MELHORAMENTO
DE PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA LIPASE LIPC12

CURITIBA

2023



LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI

ESTRATÉGIAS DE BIOIMPRINTING APLICADAS PARA MELHORAMENTO
DE PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA LIPASE LIPC12

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requerimento parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadia Krieger
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Luján Ferreira

CURITIBA
2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Wielewski, Leonardo Pellizzari

Estratégias de *bioimprinting* aplicadas para melhoramento de propriedades catalíticas da lipase LipC12 / Leonardo Pellizzari Wielewski. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof^a. Dra. Nadia Krieger.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Maria Luján Ferreira.

1. Lipase. 2. Ativação enzimática. I. Krieger, Nadia, 1952-. II. Ferreira, Maria Luján. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LEONARDO PELLIZZARI WIELEWSKI** intitulada: **Estratégias de *bioimprinting* aplicadas para melhoramento de propriedades catalíticas da lipase LipC12**, sob orientação da Profa. Dra. NADIA KRIEGER, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

09/03/2023 13:06:40.0

NADIA KRIEGER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/03/2023 09:39:54.0

LEANDRO PIOVAN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/03/2023 16:34:41.0

WANDERSON DUARTE DA ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/03/2023 16:06:15.0

GISELLA MARIA ZANIN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 263091

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 263091

AGRADECIMENTOS

Agradeço a:

Deus.

Sandra Mara Pellizzari, minha mãe, por todo o auxílio, paciência, compreensão, e por me proporcionar a oportunidade de estudar e ser o pilar fundamental para que eu me tornasse quem sou hoje.

Profa. Dra. Nadia Krieger, minha orientadora, pela oportunidade da realização do doutorado, pela orientação e por todo o conhecimento transmitido.

Profa. Dra. Maria Luján Ferreira, pela coorientação e ensinamentos transmitidos.

Vilma Pellizzari, minha tia, por todo o suporte nos momentos mais complicados.

Cristiane Tokunaga, meu amor, por toda a paciência, carinho e compreensão, pelas longas conversas, por todo o companheirismo e motivação em todos os momentos.

Professores Beatriz Gomes Guimarães e Wanderson Duarte da Rocha pela correção dos relatórios, comporem a banca de qualificação e por todas as orientações.

Professores Leandro Piovan, Gisella Zanin e Wanderson Duarte da Rocha por integrarem a banca e auxiliarem na melhoria deste trabalho com seus conhecimentos.

Leonardo Kozak Michelon, Débora Colla, Bruno Pires, Yuri Gaudeda pela amizade e bons momentos nestes anos.

Aos colegas Edileuza, Leandro, Lucas, Rocio e à dona Rose por todos os ensinamentos e contribuições.

Ao Robson Alnoch pelos ensinamentos no início da pesquisa e a todos os colegas de laboratório que em algum momento, em todos esses anos, auxiliaram de alguma forma.

*“Podemos estar cegos para o óbvio e cegos
também para a nossa cegueira”.*
Daniel Kahneman

RESUMO

A lipase LipC12 é uma enzima obtida de biblioteca metagenômica e que apresenta atividade e estabilidade em solventes orgânicos, além de ter sua estrutura previamente elucidada. Estudos prévios de imobilização e caracterização de LipC12 em meio orgânico se mostraram promissores, justificando este trabalho, que tem por objetivo geral desenvolver estratégias de *bioimprinting* aplicadas ao melhoramento das propriedades catalíticas de LipC12, como o aumento da atividade e de estabilidade (à temperatura e solventes orgânicos) da enzima. Foram conduzidos estudos da ativação de LipC12 e desenvolvidos protocolos de *bioimprinting* aplicados antes (pré-tratamento) ou depois da imobilização (pós-tratamento), utilizando diferentes agentes de *bioimprinting*, adotando protocolos já estabelecidos para a imobilização de LipC12 nos suportes comerciais Accurel MP-1000 (imobilização por adsorção) e Immobead 150-P (imobilização por ligação covalente). Constatou-se que a imobilização por adsorção somada ao *bioimprinting* não acarretou aumento da retenção da atividade e ainda ocorreram diminuições na eficiência de imobilização. Na imobilização por ligação covalente de LipC12 purificada, verificou-se que o melhor agente de *bioimprinting* foi o ácido oleico em *t*-butanol na razão de 147 nmol por 1 mg de LipC12 (AO5) com aumentos de atividade de LipC12 imobilizada de 828% para o pré-tratamento, 1210% para o pós-tratamento e de 180% no pós-tratamento feito em *n*-hexano. Para o extrato bruto de LipC12, houve aumento de 935% na atividade após o pré-tratamento com AO5 e 1355% no pós-tratamento com ácido oleico em *t*-butanol na razão de 29,4 nmol por 20 mg de proteína (AO1). Esses derivados imobilizados foram avaliados quanto à atividade de esterificação, constatando-se que LipC12 pré-tratada com AO5 apresentou ativação de 344%, equivalente 3,4 vezes o valor do controle (LipC12 imobilizada sem pré-tratamento), com atividade de esterificação de 290 U g⁻¹, além de apresentar estabilidade de 100% após 10 ciclos de reuso em reações de hidrólise em meio orgânico. O aumento da atividade observado comprova a efetividade dos efeitos da técnica de *bioimprinting* aplicada.

Palavras-chave: Lipases, imobilização, *bioimprinting*, ativação, melhoramento de propriedades enzimáticas.

ABSTRACT

The LipC12 lipase is an enzyme obtained from a metagenomic library and that presents activity and stability in organic solvents, in addition to having its structure previously elucidated. Previous immobilization and characterization studies of LipC12 in organic media have shown promise, justifying this work, which has the general objective of developing bioimprinting strategies applied to improving the catalytic properties of LipC12, such as increasing activity and stability (at temperature and solvents). organic) of the enzyme. Studies of LipC12 activation were carried out and bioimprinting protocols applied before (pre-treatment) or after immobilization (post-treatment) were developed, using different bioimprinting agents, adopting already established protocols for the immobilization of LipC12 in the commercial supports Accurel MP-1000 (adsorption immobilization) and Immobead 150-P (covalent bond immobilization). In immobilization by covalent binding of purified LipC12, it was found that the best bioimprinting agent was oleic acid in *t*-butanol at a ratio of 147 nmol per 1 mg of LipC12 (AO5) with increases in activity of immobilized LipC12 from 828% to the pre-treatment, 1210% for the post-treatment and 180% for the post-treatment done in *n*-hexane. For the crude extract of LipC12, there was an increase of 935% in activity after pre-treatment with AO5 and 1355% after treatment with oleic acid in *t*-butanol at the rate of 29.4 nmol per 20 mg of protein (AO1). These immobilized derivatives were evaluated for esterification activity, showing that LipC12 pre-treated with AO5 showed activation of 344%, equivalent to 3.4 times the control value (immobilized LipC12 without pre-treatment), with esterification activity of 290 U g⁻¹, in addition to presenting 100% stability after 10 cycles of reuse in hydrolysis reactions in organic medium. The observed increase in activity proves the effectiveness of the effects of the applied bioimprinting technique.

Keywords: Lipases, immobilization, bioimprinting, activation, enhancement of enzymatic properties

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura de α/β hidrolases.	17
Figura 2: Modelo molecular da lipase LipC12.	19
Figura 3: Métodos clássicos de imobilização.	21
Figura 4: Representação do processo de <i>bioimprinting</i>	24
Figura 5: Fluxograma da estratégia deste trabalho.	39
Figura 6: SDS-PAGE com as frações purificadas de LipC12.	56
Figura 7: (A) Densitometria por imagem do SDS-PAGE contendo as diluições do extrato bruto. (B) Densidade ótica de cada banda detectada.	57
Figura 8: Efeito do tratamento com agentes de <i>bioimprinting</i> na atividade hidrolítica contra trioleína de LipC12 livre.	58
Figura 9: Atividade de esterificação de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P após os tratamentos de <i>bioimprinting</i>	72
Figura 10: Estabilidade ao reuso de LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto com pré-tratamento de <i>bioimprinting</i> em reações de hidrólise em meio orgânico.	73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Substratos e seus análogos usados isoladamente ou em misturas como agentes de <i>bioimprinting</i> de lipases (continua).....	28
Tabela 2: Produtos, análogos aos produtos e inibidores usados isoladamente ou em misturas como agentes de <i>bioimprinting</i> de lipases	34
Tabela 3: Surfactantes e aditivos usados isoladamente ou em misturas como agentes de <i>bioimprinting</i> de lipases	36
Tabela 4: Soluções e solventes utilizados como agentes de <i>bioimprinting</i>	43
Tabela 5: Efeito da carga de proteína na imobilização de LipC12 em Accurel MP-1000	59
Tabela 6: Efeito da carga de proteína na imobilização de LipC12 em Immobead 150-P.....	60
Tabela 7: Parâmetros de imobilização em Accurel MP-1000 e atividade de hidrólise-contra trioleína de LipC12 em meio orgânico após o pré-tratamento com agentes de <i>bioimprinting</i>	62
Tabela 8: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000 após o tratamento com agentes de <i>bioimprinting</i>	63
Tabela 9: Parâmetros de imobilização em Immobead 150-P e atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 após o pré-tratamento com agentes de <i>bioimprinting</i>	65
Tabela 10: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico dos derivados imobilizados em Immobead 150-P após o pós-tratamento com agentes de <i>bioimprinting</i>	66
Tabela 11: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 purificada imobilizada em Immobead 150-P com pós-tratamento por <i>bioimprinting</i> em meio orgânico.....	67
Tabela 12: Parâmetros de imobilização em Immobead 150-P e atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 após o pré-tratamento com agentes de <i>bioimprinting</i>	69
Tabela 13: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico dos derivados imobilizados do EB em Immobead 150-P com pós-tratamento com agentes de <i>bioimprinting</i>	70

Tabela 14: Resumo das melhores condições para cada variação do processo de <i>bioimprinting</i>	71
Tabela 15: Compilado de resultados obtidos neste trabalho para os tratamentos de <i>bioimprinting</i> LipC12 immobilizada em Immobead 150-P.	77

Lista de abreviaturas, siglas e acrônimos

- AO1 – Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por (1 mg de LipC12 ou 20 mg de proteína)
- AO5 – Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por (1 mg de LipC12 ou 20 mg de proteína)
- BCA - Ácido bicinconínico
- BSA - Bovine Serum Albumin (albumina de soro bovino)
- CLEAs - Cross-linked enzyme aggregates
- CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- CTAB-AO1 – CTAB 50 mmol e ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 ou 20 mg de proteína
- CTAB-AO5 – CTAB 50 mmol e ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 ou 20 mg de proteína
- CTAB-*t*-butanol - CTAB 50 mmol e 1 mL de *t*-butanol por 1 mg de LipC12 ou 20 mg de proteína
- DMF - Dimetilformamida
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DO₆₀₀ - Densidade ótica a 600 nm de comprimento de onda
- EB - Extrato bruto
- EI – Eficiência de imobilização
- IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
- KM - Canamicina
- LA - Meio LB ágar
- LB - Meio líquido Luria Bertani
- log *P* - Logarítmo do coeficiente de partição do octanol em água
- R – Retenção de atividade
- SDS - Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
- THF - Tetrahidrofurano
- Tris - (hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Objetivos	16
2.1	Objetivos específicos	16
3	Revisão bibliográfica	17
3.1	Lipases.....	17
3.1.1	A lipase LipC12	18
3.2	Técnicas de imobilização de lipases	20
3.3	A técnica de <i>bioimprinting</i>	23
3.3.1	Tipos de aplicação e agentes de <i>bioimprinting</i>	25
3.3.1.1	Substratos e seus análogos	26
3.3.1.2	Produtos, análogos aos produtos e inibidores	32
3.3.1.3	Surfactantes e aditivos	35
4	Materiais e métodos	38
4.1	Materiais.....	40
4.2	Procedimentos experimentais	40
4.2.1	Superexpressão e purificação de LipC12.....	40
4.2.2	Agentes de <i>bioimprinting</i>	41
4.2.3	Estudos preliminares – Ativação de LipC12 livre	44
4.2.4	Ensaio de imobilização de LipC12 sem tratamento de <i>bioimprinting</i>	44
4.2.4.1	Imobilização por adsorção em Accurel MP-1000	44
4.2.4.2	Imobilização por ligação covalente em Immobead 150-P	45
4.2.5	Estratégias de <i>Bioimprinting</i>	45
4.2.5.1	<i>Bioimprinting</i> combinado à imobilização por adsorção.....	46
4.2.5.1.1	<i>Bioimprinting</i> como pré-tratamento	47
4.2.5.1.2	<i>Bioimprinting</i> como pós-tratamento.....	47
4.2.5.2	<i>Bioimprinting</i> combinado à imobilização por ligação covalente... 48	
4.2.5.2.1	<i>Bioimprinting</i> utilizando a fração purificada de LipC12.....	48
4.2.5.2.2	<i>Bioimprinting</i> utilizando o extrato bruto de LipC12	49
4.2.6	Reutilização de LipC12 imobilizada em reações de hidrólise em meio orgânico.....	49
4.3	Métodos analíticos	50
4.3.1	Eletroforese SDS-PAGE	50
4.3.2	Densitometria SDS-PAGE.....	50

4.3.3	Determinação da atividade de LipC12 por método titulométrico .	50
4.3.4	Quantificação do teor de proteínas	52
4.3.5	Cálculo da eficiência de imobilização e retenção da atividade....	52
4.3.6	Determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico	53
4.3.7	Determinação da atividade de esterificação.....	54
4.3.8	Determinação dos ácidos graxos por método colorimétrico.....	54
4.3.9	Tratamento estatístico dos dados	55
5	Resultados	56
5.1	Superexpressão e purificação de LipC12.....	56
5.2	Estudos preliminares – Ativação de LipC12 livre	57
5.3	Ensaio de imobilização de LipC12 sem tratamento de <i>bioimprinting</i>	58
5.3.1	Imobilização por adsorção em Accurel MP-1000	58
5.3.2	Imobilização por ligação covalente em Immobead 150-P	59
5.4	Estratégias de <i>bioimprinting</i>	60
5.4.1	<i>Bioimprinting</i> combinado à imobilização por adsorção.....	60
5.4.1.1	Pré-tratamento de LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000	61
5.4.1.2	Pós-tratamento de LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000	62
5.4.2	<i>Bioimprinting</i> combinado à imobilização por ligação covalente... ..	64
5.4.2.1	<i>Bioimprinting</i> utilizando a fração purificada de LipC12.....	64
5.4.2.1.1	Pré-tratamento de LipC12 purificada imobilizada em Immobead 150-P	64
5.4.2.1.2	Pós-tratamento de LipC12 purificada imobilizada em Immobead 150-P	65
5.4.2.2	<i>Bioimprinting</i> utilizando o extrato bruto de LipC12	68
5.4.2.2.1	Pré-tratamento do extrato bruto de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P.....	68
5.4.2.2.2	Pós-tratamento do extrato bruto de de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P.....	69
5.5	Caracterização dos derivados imobilizados com maior atividade relativa	70
5.5.1	Determinação da atividade de esterificação – reação de síntese do oleato de etila.....	71
5.5.2	Estabilidade de LipC12 imobilizada com tratamento de <i>bioimprinting</i> após ciclos de reuso	72

6	Discussão dos resultados	74
7	Conclusões	81
8	Perspectivas.....	84
	Referências bibliográficas	85

1 INTRODUÇÃO

O grupo de pesquisa em Tecnologia Enzimática e Biocatálise da UFPR (LTEB) vem trabalhando com técnicas de biologia molecular, inclusive a metagenômica, para a obtenção de novas lipases ou para melhoramento de lipases já isoladas, como a lipase LipC12.

LipC12 foi obtida a partir de uma biblioteca metagenômica de solo contaminado com gordura animal por Glogauer et al. (2011), apresentando valores de atividade de hidrólise de triacilglicerídeos de cadeia longa provenientes de fontes naturais (como a trioleína, componente majoritário do azeite de oliva) semelhantes aos de lipases comerciais (lipases dos fungos *Rhizopus oryzae* com 1000 U mg⁻¹, *Rhizomucor miehei* com 3300 U mg⁻¹ e *Thermomyces lanuginosus* com 2900 U mg⁻¹), além de apresentar atividade e estabilidade em soluções aquosas contendo solventes orgânicos (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, THF, dioxana, DMSO, DMF e glicerol) em concentrações de até 30% (v/v). Ensaio de imobilização e caracterização em meio orgânico foram realizados por Madalozzo et al. (2015), que imobilizaram LipC12 purificada no suporte Immobead 150-P, resultando em maior estabilidade ao armazenamento, a solventes hidrofílicos e hidrofóbicos após 24 h de incubação. LipC12 também foi aplicada na hidrólise regioselectiva do substrato peracetilado *D*-glucal, apresentando 69% de conversão do produto C-3 mono-desacetilado após 96 h (ALNOCH et al., 2016). Tais resultados indicam potencial biotecnológico de LipC12, entretanto, melhorias ainda podem ser obtidas em relação à sua atividade e estabilidade frente a solventes orgânicos, aprimoramento que pode ser alcançado com a utilização da técnica de *bioimprinting* associada ao processo de imobilização.

Bioimprinting consiste em realizar mudanças conformacionais em lipases, alterando-as para uma forma ativa, geralmente decorrente da abertura da *lid*. Essas alterações podem ser induzidas em meio aquoso através de interações com compostos anfífilicos, chamados de agentes de *bioimprinting* ou compostos-molde, como o ácido oleico, álcoois ou surfactantes, que interagem com a lipase. Com a remoção do composto anfífilico através da lavagem com solvente anidro, a proteína mantém a conformação obtida após a interação com

o composto (GONZÁLEZ-NAVARRO e BRACO, 1997), sendo que esta nova conformação pode ser estabilizada através de processos de imobilização.

Enzimas imobilizadas têm sido amplamente empregadas em diferentes aplicações industriais, notadamente nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia, bem como em biomedicina, em processos industriais analíticos, em processos de agregação de valores a *commodities*, além de processos para produção de combustíveis e energia (DI COSIMO et al., 2013; ANSORGE-SCHUMACHER e THUM, 2013; BASSO e SERBAN, 2019; WU et al., 2021; BOLIVAR et al., 2022). Tais aplicações só são possíveis devido ao aumento da atividade e da estabilidade térmica e a solventes orgânicos das enzimas imobilizadas. Além disso, a imobilização proporciona a simplificação da separação dos produtos do meio reacional e a reutilização da enzima imobilizada, com potencial de reduzir os custos do processo biocatalisado.

A combinação de técnicas de *bioimprinting* e imobilização, aplicadas à lipase LipC12 pode gerar derivados imobilizados com mais atividade, estabilidade e seletividade visando aplicações em reações de interesse em biocatálise, justificando este trabalho, cujos objetivos estão descritos a seguir.

2 OBJETIVOS

Aplicar estratégias de *bioimprinting* aliadas a processos de imobilização para melhorar o desempenho catalítico da lipase LipC12 para aplicação em processos biocatalíticos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os agentes de *bioimprinting* que proporcionem maior atividade e estabilidade à LipC12 livre;
- Aplicar os agentes de *bioimprinting* selecionados no tratamento de LipC12 antes (pré-tratamento) e depois da imobilização (pós-tratamento) nos suportes Accurel MP-1000 e Immobead 150-P, avaliando-se a influência do *bioimprinting* somado à imobilização;
- Caracterizar os derivados imobilizados, determinando-se suas atividades de hidrólise contra a trioleína e de esterificação em meio orgânico;
- Determinar a estabilidade de LipC12 imobilizada ao reuso após ciclos de reação de hidrólise da trioleína em meio orgânico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPASES

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que, em condições naturais catalisam a hidrólise de ésteres carboxílicos em meio aquoso, porém, em meios com restrição de água, podem ser utilizadas na síntese de ésteres carboxílicos com ação regio-, quimio- e enantiosseletiva, sendo utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas (JAEGER et al., 1994; KAPOOR e GUPTA, 2012).

Estas enzimas possuem estrutura típica, apresentando na conformação terciária de dobramento α/β hidrolase (Figura 1), formando um núcleo composto por uma folha- β central, constituído de oito fitas β distintas, interligadas a seis α -hélices (SCHRAG e CYGLER, 1997). A tríade catalítica do sítio ativo das lipases é formada pelos resíduos de aminoácidos histidina, serina e ácido aspártico ou ácido glutâmico. Estes resíduos de aminoácido se encontram em uma região altamente conservada, na região C-terminal da fita β -5 (ARPIGNY e JAEGER, 1999).

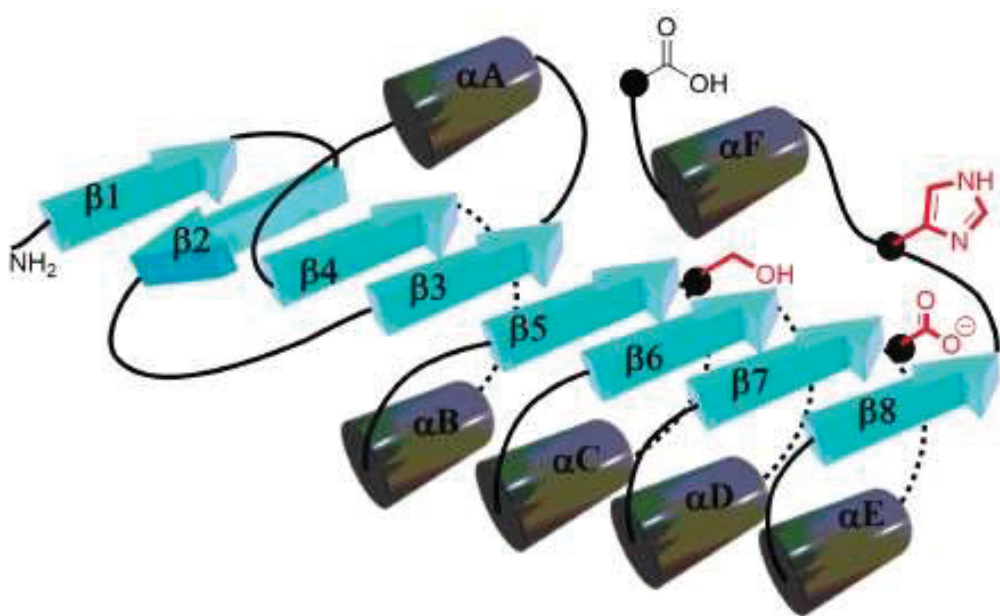


Figura 1: Estrutura de α/β hidrolases.

Fonte: Adaptado de Casas-Godoy et al. (2012) por Santos (2021).

Além da região catalítica, observa-se uma estrutura peptídica móvel, o domínio *lid* que recobre o sítio ativo da maioria das lipases na posição β -8 (Figura 1). A movimentação do domínio *lid* de lipases em interfaces aquosas não polares é conhecida como ativação interfacial, e é comumente associada ao aumento da atividade catalítica destas enzimas em interfaces hidrofóbicas (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; PALOMO et al., 2002). A ocorrência ativação interfacial é utilizada para explicar a ativação que ocorre pela aplicação da técnica de *bioimprinting* em lipases.

Lipases são amplamente empregadas na hidrólise de gorduras e óleos, modificações estruturais de gorduras, resolução de racematos, síntese de agroquímicos e de biopolímeros, produção de biodiesel, dentre diversas outras aplicações. Devido a sua ampla aplicação, lipases possuem apelo industrial, em especial lipases de origem microbiana, pois possuem elevada disponibilidade e baixo custo de obtenção quando comparadas às lipases não bacterianas (JAVED et al., 2018; HASAN et al., 2006).

Devido à grande biodiversidade dos microrganismos, buscas por novas lipases com características diferenciadas são constantemente realizadas (ARPIGNY et al., 1999). Dentre as lipases não comerciais recentemente isoladas e caracterizadas, encontra-se a lipase LipC12, cujas características estão apresentadas a seguir.

3.1.1 A lipase LipC12

A lipase LipC12 (Figura 2) foi isolada a partir da técnica de metagenômica aplicada a amostras de solo contaminado com gordura animal. Esta lipase apresenta cadeia monomérica de 293 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 33 kDa, 72% de identidade com a putativa lipase de *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleoartica* Y11, e de acordo com a análise filogenética, LipC12 pertence à família I.1, mesma família que estão classificadas as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia mollaretii* e *Proteus vulgaris* (GLOGAUER et al., 2011). Além disso, em pesquisa recente na plataforma NCBI realizada por Kloster (2021) utilizando a ferramenta BLAST, LipC12 apresentou similaridade de mais de 90% com lipases de *Cedecea davisae* (98%), *C. neteri* (92%) e *C. lapagei* (91%).

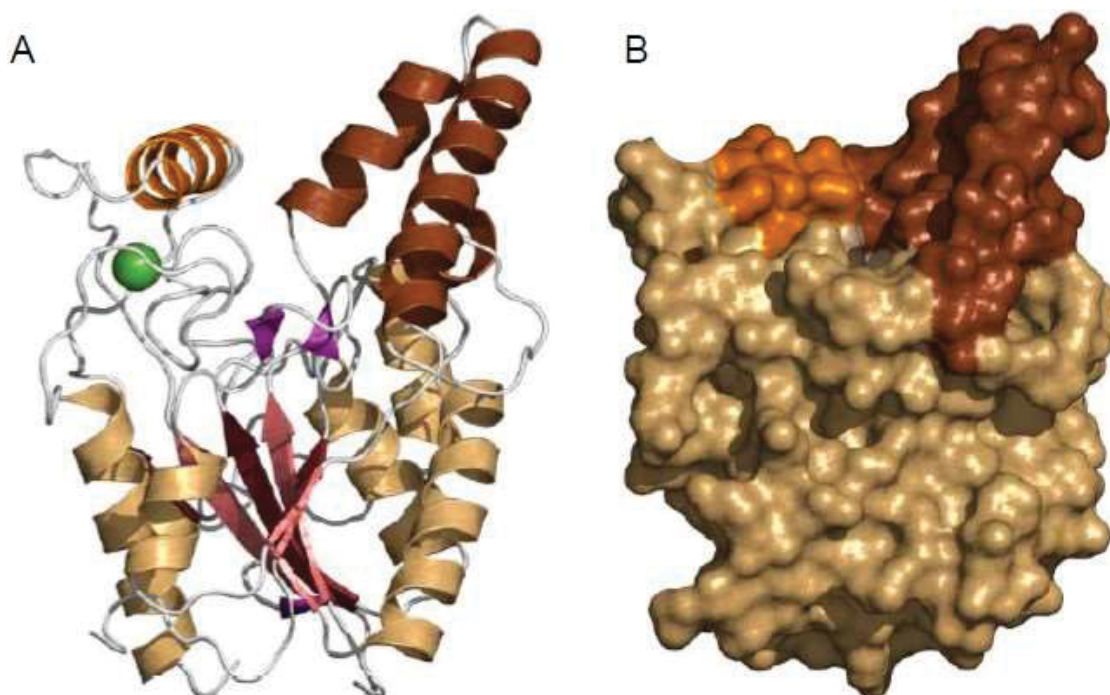


Figura 2: Modelo molecular da lipase LipC12.

Em (A) é destacado o sítio de ligação ao íon cálcio representado por esfera verde, enquanto em (B) a estrutura *lid* é destacada em marrom escuro e laranja.
 Fonte: Glogauer et al. (2011).

Para a caracterização de LipC12, estudos foram realizados em meio aquoso, indicando que a lipase é estável em concentrações de NaCl até 3,7 mol L⁻¹, possui atividade catalítica na faixa de 20 a 50 °C, sendo 30 °C a temperatura de máxima atividade, além de apresentar 100% de retenção da atividade após incubação em solventes orgânicos (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, tetrahydrofurano (THF), dioxana, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e glicerol) a 30% em período de 48 h (GLOGAUER et al., 2011).

A fração purificada de LipC12 foi utilizada em ensaios de atividade de hidrólise em meio aquoso contra óleo de oliva e gordura de porco, apresentando, respectivamente, 1722 U mg⁻¹ e 1767 U mg⁻¹, valores de atividades comparáveis aos obtidos com lipases comerciais como *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus*. Além disso, LipC12 possui estabilidade em temperaturas moderadas e em soluções com até 30% (v/v) de solventes orgânicos como metanol, propanol ou acetona (GLOGAUER et al., 2011).

Os resultados promissores de caracterização publicados por Glogauer et al. (2011) motivaram Madalozzo et al. (2015) na continuação dos estudos de imobilização e caracterização da lipase LipC12 em meio orgânico. LipC12

purificada foi imobilizada em suporte comercial Immobead 150-P, um polímero acrílico, e o derivado imobilizado aplicado na síntese do oleato de etila (a partir do etanol e ácido oleico) em *n*-heptano, apresentando atividade de esterificação de 91 U g⁻¹ de suporte e conversão em éster de 99% em 1 h. Esta mesma preparação foi avaliada quanto à estabilidade ao reuso, restando mais de 95% de atividade inicial após 10 ciclos reacionais. Entretanto, quando LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto foi utilizada na síntese do oleato de etila em meio livre de solventes (no qual os substratos são também os solventes da reação), o etanol teve que ser adicionado de forma fracionada, mantendo-se a proporção etanol:ácido oleico (1:1), para evitar a desnaturação de LipC12, alcançando, desta forma, 85% de conversão em 48 h.

Tendo em vista os resultados obtidos com LipC12, verifica-se que a enzima é uma boa candidata ao melhoramento de atividade, estabilidade e seletividade, principalmente em solventes orgânicos, para aplicação em síntese de ésteres e na resolução cinética de racematos, motivando estudos de melhoramento de suas propriedades catalíticas por aplicação da técnica de *bioimprinting* aliada aos processos de imobilização, visando aplicações em biocatálise.

3.2 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Na maior parte dos processos biotecnológicos industriais, a imobilização de enzimas pode proporcionar aumento da atividade, estabilidade, seletividade e especificidade aprimorada e diminuição de interações inibitórias (PESSELA et al., 2003; MATEO et al., 2004; GABROVSKA et al., 2008; GARCIA-GALAN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013). Além disso, citam-se inúmeras vantagens da imobilização, como: possibilitar controles mais rígidos e rigorosos dos processos aplicados à síntese controlada cineticamente (KASCHE, 1986; GIORDANO et al., 2006; MARSDEN et al., 2020); prevenir a contaminação do produto pela enzima, sejam produtos alimentícios ou farmacêuticos (BASSO e SERBAN, 2019; HASSAN et al., 2019; TAVANO et al., 2018); possibilitar a utilização de biocatalisadores em diferentes tipos de reatores (LINDEQUE e WOODLEY, 2019; SHELDON et al., 2021; MARQUES et al., 2021); proporcionar a intensificação de processos, na qual almeja-se o aumento da velocidade da

reação pela utilização de altas concentrações de enzima (MARQUES et al., 2021); facilitar processos de purificação dos produtos (HERNANDEZ e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; BARBOSA et al., 2013; BARBOSA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2019).

Estratégias diversas têm sido empregadas para imobilizar lipases (Figura 3), como a adsorção física por interações iônicas ou hidrofóbicas, a imobilização por ligações covalentes mono e multipontuais, a produção de cristais ou agregados de enzimas reticuladas (CLEC, CLEA *cross-linked enzyme aggregate*), e o encapsulamento ou aprisionamento de enzimas em matrizes sol-gel (MATEO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2019; SHELDON, 2007; XU et al., 2018; ALNOCH et al., 2020).

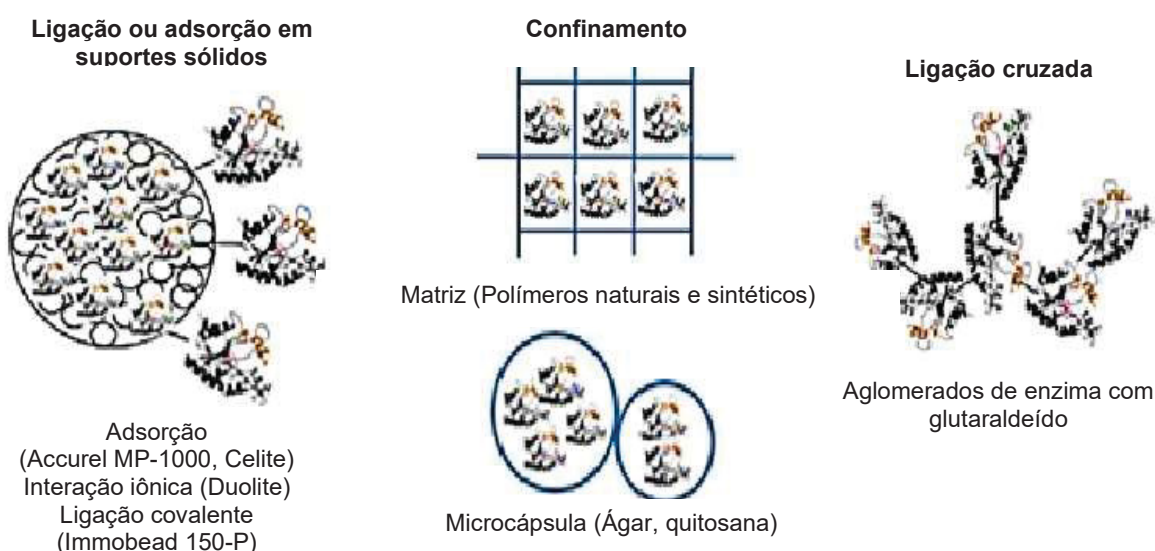


Figura 3: Métodos clássicos de imobilização.

Fonte: Madalozzo et al. (2015).

Dentre todas essas opções, a adsorção física por interação hidrofóbica é a mais explorada para a imobilização de lipases por não acarretar diminuição da mobilidade da lipase, o que pode causar diminuição da atividade catalítica (MATEO et al., 2007). De forma simplificada, a imobilização via adsorção por interação hidrofóbica consiste em adsorver a lipase a suportes hidrofóbicos e altamente porosos. Em alguns casos, devido ao fato de lipases possuírem “caminhos” hidrofóbicos, o processo de imobilização pode se dar de forma

específica, com adsorção seletiva de lipases, propiciando a aplicação da técnica simultaneamente como procedimento de purificação (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; PALOMO et al., 2002). A imobilização por interação hidrofóbica pode fixar a lipase em sua conformação “aberta” de forma predominante, acarretando derivados imobilizados mais ativos e com maior seletividade (CABRERA e PALOMO, 2011; CALLAGHAN et al., 2017). Entretanto, a adsorção de enzimas a suportes hidrofóbicos é reversível, acarretando lixiviação das lipases do suporte quando utilizadas em meio aquoso, processo potencializado na presença de surfactantes, solventes orgânicos e em alguns casos, até mesmo devido a interações com os próprios substratos, limitando a aplicação do derivado imobilizado em meios aquosos (MATEO et al., 2007; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017).

O suporte hidrofóbico comercial Accurel MP-1000, um polipropileno altamente poroso, é bastante utilizado na imobilização de lipases devido à sua alta porosidade, além de proporcionar a ativação de lipases (ALMEIDA et al., 2008; KAEWTHONG et al., 2005). Kaewthong et al. (2005) destacaram uma maior atividade e estabilidade da lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada em Accurel EP-100 do que o observado em derivados imobilizados utilizando Celite, sílica gel e CaCO_3 . Sabbani et al. (2006) relataram variação na enantiosseletividade da lipase de *Candida rugosa* quando derivados imobilizados utilizando os suportes Accurel EP-100, Accurel MP-1001 e Accurel MP-1000 foram utilizados, destacando-se que, no suporte Accurel EP-100 foi observado maior coeficiente enantiomérico ($E = 16,7$ na melhor condição) na reação de esterificação entre o ácido 2-metil-hexanoico e 1-decanol em isooctano. Especificamente para LipC12, que apresenta uma *lid*, esta forma de imobilização pode envolver áreas com características hidrofóbicas próximas ao sítio ativo, favorecendo a imobilização da lipase em sua conformação aberta, o que pode proporcionar a ativação da lipase pelo simples processo de imobilização, além de aumentos na enantiosseletividade.

Já a imobilização por ligações covalentes ocorre entre resíduos de aminoácidos presentes na superfície da lipase e grupos funcionais presentes no suporte (MURTY et al., 2002), de forma que a ligação estabelecida entre o suporte e a enzima seja muito resistente, impedindo a sua lixiviação em meios aquosos. Quando conduzida a imobilização por ligações covalentes

multipontuais, a enzima torna-se mais estável em condições adversas como aumento da temperatura, diferentes faixas de pH e solventes orgânicos devido ao aumento do grau de rigidez da molécula (MATEO et al., 2007). Por outro lado, os custos operacionais mais elevados em relação ao processo de adsorção e o excesso de rigidez, que pode alterar a capacidade catalítica da enzima de forma negativa, são desvantagens apontadas para a imobilização por ligações covalentes (HANEFELD et al., 2009; MATEO et al., 2007; FORESTI et al., 2005).

Um dos suportes que tem sido utilizados para imobilização de lipases por ligação covalente é a resina comercial Immobead 150-P, um suporte ativado com grupos epóxido, que consiste de microesferas porosas originadas da copolimerização do *N,N'*-metileno-bis-metacrilamida, glicidil-metacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida (KNEZEVIC et al., 2006; KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000). Este material possui elevada carga de grupamentos epóxido disponíveis em sua superfície (600 mol g^{-1} de suporte), possibilitando o estabelecimento de ligações covalentes em diferentes pontos de ancoragem na superfície das microesferas, fenômeno denominado “ligação multipontual”, acarretando em maior estabilidade operacional dos derivados imobilizados (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000). LipC12 foi imobilizada com sucesso neste suporte por Madalozzo et al. (2015), apresentando atividade (161 U g^{-1}) estabilidade após incubação em solventes orgânicos (etanol, *i*-propanol, propanol, butanol, tolueno, *n*-hexano, *n*-heptano e *i*-octano), a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 A TÉCNICA DE *BIOIMPRINTING*

O conceito “*imprinting*” foi primeiramente apresentado por Wulff (1972) para polímeros orgânicos, com base na formação de um polímero inter cruzado ao redor de uma molécula que atua como molde. Com a remoção do molde, a molécula moldada continua com grupamentos funcionais capazes de estabelecer interações. Por derivação, o termo *bioimprinting* é o *imprinting* de biopolímeros, ancorado no mesmo conceito. Para enzimas, o processo ocorre em meio aquoso com a complexação do sítio ativo com um análogo ao substrato ou ao produto, como ácidos graxos (SAMPATH et al., 2018; GAO et al., 2016; WANG et al., 2014), surfactantes (MUKHERJEE e GUPTA, 2015; MUKHERJEE e GUPTA; 2016a; YILMAZ, 2002a), inibidores (YILMAZ, 2003) ou produtos

(DIAZ-VIDAL et al., 2019; LIU et al., 2013), formando um complexo similar ao estado de transição enzima-substrato.

Acredita-se que, durante o processo de *bioimprinting* de lipases, ocorram algumas pequenas alterações conformacionais, denominadas de “ajuste induzido”, seja no túnel catalítico, na superfície da enzima e, principalmente, no domínio *lid* que recobre o túnel catalítico da maioria das lipases (LIU et al., 2011; WEISER et al., 2016; HILAL et al., 2004; YAN et al., 2009; YILMAZ, 2002a; GONZÁLEZ-NAVARRO e BRACO, 1997; GONZÁLEZ-NAVARRO e BRACO, 1998; YILMAZ, 2003).

Partindo desse conjunto de informações e com base na literatura encontrada, neste trabalho define-se *bioimprinting* (Figura 4) como um processo que promove mudanças conformacionais em lipases, podendo alterá-las para uma forma ativa, decorrente da abertura da *lid*, induzida em meio aquoso por meio de interações com compostos anfifílicos, chamados de agentes de *bioimprinting* ou compostos-molde, como o ácido oleico, álcoois ou surfactantes, que interagem com a lipase. Após a remoção do composto anfifílico através de lavagem com solvente anidro, a proteína mantém a conformação obtida após a interação com o composto (GONZÁLEZ-NAVARRO e BRACO, 1997).

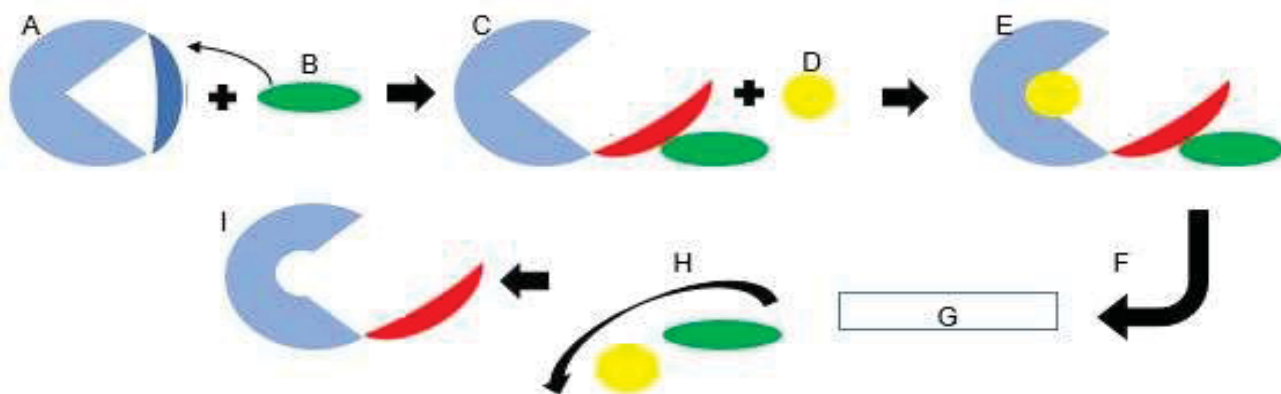


Figura 4: Representação do processo de *bioimprinting*.

Legenda: A: Lipase na conformação fechada; B: agente de *bioimprinting* I; C: Lipase na conformação aberta por ação do agente de *bioimprinting* I; D: Agente de *bioimprinting* II; E: Lipase em conformação aberta sob ação do agente de *bioimprinting* I e II; F: Processo de secagem, liofilização ou imobilização; G: Lavagem com solvente hidrofóbico; H: Remoção dos agentes de *bioimprinting*; I: Lipase em nova conformação estrutural com lid na posição aberta e sítio ativo moldado.

Fonte: O autor

Quando este complexo é transferido para um meio aquo-restrito contendo solvente orgânico, o ligante (agente de *bioimprinting* que funciona

como molde, Figura 4) é removido e a enzima é incapaz de retornar a sua conformação original devido a fortes interações eletrostáticas em meios que possuam baixas constantes eletrostáticas, enrijecendo a sua estrutura e mantendo-a na conformação moldada pelo agente de *bioimprinting*. Este processo pode aumentar a atividade e estabilidade de lipases em meios aquo-restritos (YILMAZ, 2003; FORESTI et al., 2005) pela alteração das forças eletrostáticas e de ligações de hidrogênio entre os resíduos superficiais da proteína. O processo é recomendado para lipases empregadas em condições nas quais a água não é o solvente, onde as enzimas tendem a ficar na conformação adotada após o *bioimprinting*, devido ao enrijecimento estrutural ocasionado pela falta de moléculas de água no meio reacional (SAMPATH et al., 2018; LIU et al., 2011; CAO et al., 2009; FISHMAN e COGAN, 2003).

3.3.1 Tipos de aplicação e agentes de *bioimprinting*

No processo de imobilização, o contato entre o agente de *bioimprinting* e a lipase pode ocorrer de três formas principais: (I) como pré-tratamento, no qual a lipase livre é incubada em solução com agente de *bioimprinting*, em seguida passa pelo processo de imobilização, para então a remoção do agente de *bioimprinting* (SAMPATH et al., 2018; YANG e ZHANG, 2019); (II) pelo tratamento simultâneo à imobilização, adicionando-se o agente de *bioimprinting* à solução de lipase oferecida para imobilização ou à solução contendo componentes da matriz sol-gel (SÁNCHEZ et al., 2021; WEISER et al., 2016); e (III) na forma de pós-tratamento, no qual a enzima é imobilizada e então o derivado imobilizado é incubado com agentes de *bioimprinting*, seguindo-se a remoção dos agentes (LI et al., 2018; FORESTI et al., 2005).

Os agentes de *bioimprinting* variam de acordo com a lipase utilizada, pois a interação destes compostos com a *lid* ou regiões próximas ao sítio ativo pode ser diferente devido à especificidade de cada enzima e à presença e tamanho da *lid* de cada lipase. Neste trabalho, os agentes de *bioimprinting* foram classificados de acordo com sua função e estrutura em: (1) substratos e seus análogos; (2) produtos, análogos aos produtos e inibidores; (3) surfactantes e aditivos. Cumpre ressaltar que estes agentes são empregados de maneira

isolada ou em misturas entre eles. Abaixo serão apresentados e discutidos os agentes de *bioimprinting* de acordo com esta classificação.

3.3.1.1 Substratos e seus análogos

Uma seleção de artigos que utilizaram substratos e seus análogos está mostrada na Tabela 1. Para a seleção destes artigos, os substratos foram definidos de acordo com o tipo de reação estudada: reação de hidrólise, os substratos são triglicerídeos; reação de esterificação, são ácidos graxos e álcoois, e se forem reações de transesterificação, álcoois e triglicerídeos.

Verifica-se (Tabela 1) que as formas mais utilizadas de *bioimprinting* são o pré-tratamento e o tratamento simultâneo à imobilização (11 artigos), enquanto o menos utilizado é o pós-tratamento. Para o pós-tratamento, foram encontrados apenas dois artigos: no trabalho de Foresti et al. (2005), a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em polipropileno foi incubada em tampão pH 7,0 contendo etanol e ácido oleico, por 20 min, em temperatura ambiente e com agitação de 1000 rpm. Após a incubação o sólido foi recuperado, lavado com octano para remoção do agente de *bioimprinting* e seco por 1 h a 50 °C para remoção do solvente. O tratamento aumentou a atividade de esterificação em 68%, na reação entre ácido oleico e etanol. Uma das vantagens do pós-tratamento é a praticidade, já que apenas um derivado imobilizado é produzido, favorecendo a homogeneidade do material e estabelecendo um ponto de partida em comum e condicionalmente idêntico para todos os experimentos de *bioimprinting* subsequentes, sejam eles com variação da massa ou natureza de ácido utilizado, variação do tempo de incubação ou solvente para remoção do agente de *bioimprinting*.

Li et al. (2018) também adotaram o processo de *bioimprinting* como um pós-tratamento. Os autores descrevem a confecção das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com dendrímeros de melanina-glutaraldeído para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*. Após a imobilização, o derivado imobilizado foi disperso em 1,2 mL de várias combinações de solventes orgânicos, com incubação por 1 h, à temperatura ambiente, e então liofilizado. Após a liofilização, o derivado imobilizado foi lavado com *n*-heptano para remoção dos agentes de *bioimprinting* e avaliado frente a atividade de

esterificação na reação entre ácido láurico e 1-dodecanol e na resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila. Houve diminuição no tempo para a atividade de esterificação de 180 min para 20 min e aumento do excesso enantiomérico do substrato (ee_s) de 77,4% em 60 min para 98,8% em 20 min.

Tabela 1: Substratos e seus análogos usados isoladamente ou em misturas como agentes de *bioimprinting* de lipases (continua)

Agente de <i>bioimprinting</i> (melhor)	Fonte de Lipase	Suporte/ Forma de imobilização	Etapa de <i>bioimprinting</i> / Tempo de incubação	Principais resultados/substratos	Referência
Ácido oleico	LipC12	Polipropileno em pó/Adsorção	Simultâneo/ 6 h	Aumento de aproximadamente 90% na conversão do ácido oleico na esterificação e na atividade de hidrólise do óleo de soja	Sánchez et al. (2021)
Ácido fórmico, Tween 20 e etanol	<i>Candida rugosa</i> (CRL)	Enzima livre (comercial)	Simultâneo/ 30 min	Aumento de 2 vezes na atividade de transesterificação (acetato de vinila e álcool benzílico, 1:1).	Matsumoto et al. (2021)
Ácido láurico e <i>i</i> -propanol	<i>Burkholderia cepacia</i> (BCL) comercial	Enzima livre (comercial)	Simultâneo/ 60 min	Aumento de 70 vezes na atividade de esterificação (ácido láurico e mistura (1:1) etanol:butanol, 1:8).	Brandão et al. (2021)
Ácido palmítico e <i>i</i> -propanol	Pancreática suína (PPL) comercial			Aumento de 4 vezes na atividade de esterificação (ácido láurico e mistura (1:1) etanol:butanol, 1:8).	
Ácido octanóico, Tween 20 e etanol	<i>Candida rugosa</i> (CRL)	Enzima livre (comercial)	Simultâneo/ 20 min	Aumento de 75% na atividade de esterificação (ácido láurico e álcool benzílico, 1:1).	Matsumoto e Hasegawa (2018)
Ácido oleico, Tween 60 e etanol	<i>Candida rugosa</i> (CRL)	CLEA ^a	Pré-tratamento/ 30 min	Aumento de 10,4 vezes na atividade de hidrólise, gerando 2,83 vezes mais <i>n</i> -PUFA ^f .	Sampath et al. (2018)
Acetato de vinila	<i>Burkholderia cepacia</i> (BCL)	NPMfmgd/Interação covalente ^b	Pós-tratamento/ 60 min	Aumento da atividade de esterificação (ácido láurico e 1-dodecanol 1:9), aumento da conversão e da enantioseletividade em menor tempo.	Li et al. (2018)
Ácido decanóico e acetona	<i>Burkholderia cepacia</i> (BCL)	CLEA	Pré-tratamento/ 60 min	Aumento da atividade de esterificação de 27,4% (ácido láurico 100 mg e <i>n</i> -octanol 0,2 mL).	Gao et al. (2016)
Ácido láurico em solução com sorbitol, sacarose e lecitina	<i>Rhizopus oryzae</i> (ROL)	Resina NKA ^c /Adsorção	Simultâneo/ 10 min	Aumento de 209,5% na atividade de esterificação (ácido láurico e laurinol 1:1).	Su et al. (2014)
Ácido palmítico e PEG ^d 1000	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL 100L)	Nanogel de poliacrilamida/ Encapsulamento	Simultâneo/ NI ^e	Aumento de 476% na atividade de esterificação (palmitato de <i>p</i> -nitrofenila 10 mmol L ⁻¹ e álcool <i>n</i> -butílico 30 µL).	Wang et al. (2014)
Ácido palmítico	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL 100 L)	Nanogel de poliacrilamida/ Encapsulamento	Simultâneo/ NI ^e	Aumento de 2 vezes na atividade de transesterificação (cloranfenicol e palmitato de vinila 1:5) com rendimento de acima de 99% e pureza de acima de 99% em 12 h.	Wang et al. (2013)
Ácido láurico e <i>n</i> -heptano	<i>Yarrowia lipolytica</i> (YILIP2)	Resina de troca catiônica D152H/ Adsorção	Pré-tratamento/ 60 min	Aumento na atividade de esterificação (ácido láurico e dodecanol 1:1) em 21,5 vezes, e aumento da atividade de hidrólise do azeite de oliva de 2,1 vezes.	Yan et al. (2013)

a: CLEA: Agregados enzimáticos reticulados, do inglês “*cross-linked enzyme aggregates*”; **b:** NPMfmgd: Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com melamina glutaraldeído tipo dendrímero; **c:** NKA: Resina de poliestireno hidrofóbica macroporosa, com tamanho de partícula de 300 a 1250 µm, área específica de 570 a 590 m² g⁻¹ e diâmetro de poro de 200 a 220 Å; **d:** PEG: Polietilenoglicol; **e:** NI Não Informado; **f:** PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 1: Substratos e seus análogos usados isoladamente ou em misturas como agentes de *bioimprinting* (continuação)

Agente de <i>bioimprinting</i> (melhor)	Fonte de Lipase	Suporte/ Forma de imobilização	Etapa de <i>bioimprinting</i> / Tempo de incubação	Principais resultados	Referência
(R)-2-octanol, Triton X-100 e isopropanol	<i>Yarrowia lipolytica</i> (YLL)	Resina macroporosa D4020/Adsorção	Pré-tratamento/ 30 min	Aumento de 8,85 vezes na atividade de esterificação ((R-S)-2-octanol e acetato de vinila 1:2). e aumento na enantioseletividade da resolução cinética do de 2,75 vezes com 51% de conversão	Liu et al. (2013)
Ácido oleico	<i>Rhizopus orizae</i> (ROL)	Células inteiras	Pré-tratamento/ NI ^e	Aumento na atividade de esterificação (óleo de soja e metanol 1:4) de 46%.	Chen et al. (2012)
Ácido oleico	<i>Candida antarctica</i> (CALA)	Duolite A568/ Adsorção	Pré-tratamento/ 10 min	Aprimoramento na esterificação (óleo de peixe 1 g e etanol 0,2 mL) com diminuição de perda de PUFA ω-3 de 3,76 para 1,47 mol%.	Kahveci e Xu (2012)
Ácido oleico, Tween 60 e etanol	<i>Candida rugosa</i> (CRL) <i>Candida antarctica</i> (CALA)	Duolite A568/Adsorção	Pré-tratamento/ 20 min	Aumento de 8 vezes na atividade de transesterificação (óleo de salmão 1g e etanol 0,2 mL). Alteração na enantioseletividade, e diminuição de 5,5 vezes de PUFAs ^f nos etil-ésteres.	Kahveci e Xu (2011)
Ácido láurico e <i>i</i> -propanol	<i>Burkholderia cepacia</i> (BCL)	Resina NKA/Adsorção	Pré-tratamento/ 60 min	Aumento de 21,7 vezes na atividade de esterificação (ácido oleico e etanol 6:1).	Liu et al. (2011)
Ácido palmítico e PEG ^d 400	<i>Geotrichum sp.</i>	CLEA ^a	Pré-tratamento/ NI ^e	Aumento na termoestabilidade e atividade de hidrólise de resíduos de óleo de peixe chegando a 46%.	Yan et al. (2010)
Ácido láurico e componentes da matriz sol-gel	<i>Burkholderia cepacia</i> (extrato bruto)	Matriz Sol-gel/ Aprisionamento	Simultâneo/ 5 min	Aumento de 14,4 vezes na atividade de esterificação (ácido láurico e álcool laurílico 1:1).	Yang et al. (2010)
Ácido oleico e <i>t</i> -butanol	<i>Geotrichum sp.</i>	Resina macroporosa/ Adsorção	Pré-tratamento/ 10 min	Aumento de 18,4 vezes na atividade de esterificação (ácido oleico e metanol 1:1,2)	Yan et al. (2009)
Ácido láurico e PEG ^d	<i>Burkholderia cepacia</i>	Matriz Sol-gel/ Aprisionamento	Simultâneo/ 5 min	Aumento 47,9 vezes na atividade de esterificação (ácido láurico e álcool laurílico 1:1)	Cao et al. (2009)
Mistura comercial de ácidos graxos e etanol	<i>Candida rugosa</i> (CRL)	Pó de polipropileno/ Adsorção	Pós-tratamento/ 20 min	Aumento de 68% na atividade de esterificação (ácido oleico e etanol 6:1)	Foresti et al. (2005)
Ácido oleico e <i>n</i> -butanol	<i>Candida rugosa</i> (CRL)	Adsorção/CLEA ^a sobre membrana filtrante tipo PTFE	Simultâneo/ NI ^e	Aumento na atividade de esterificação (ácido oleico e <i>n</i> -butanol 1:1) de até 4% em 3,5 h.	Hilal et al. (2004)

a: CLEA: Agregados enzimáticos reticulados, do inglês “cross-linked enzyme aggregates”; b: NPMfmgd: Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com melamina glutaraldeído tipo dendrímero; c: NKA: Resina de poliestireno hidrofóbica macroporosa, com tamanho de partícula de 300 a 1250 µm, área específica de 570 a 590 m² g⁻¹ e diâmetro de poro de 200 a 220 Å; d: PEG: Polietilenoglicol; e: NI: Não Informado; f: PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 1: Substratos e seus análogos usados isoladamente ou em misturas como agentes de *bioimprinting* (continuação)

Agente de <i>bioimprinting</i> (melhor)	Fonte de Lipase	Suporte/ Forma de imobilização	Etapa de <i>bioimprinting</i> / Tempo de incubação	Principais resultados	Referência
Ácido decanoico, etanol e Tween 20	<i>Candida rugosa</i> (CRL)			Aumento na atividade de transesterificação (acetato de vinila e 1-feniletanol 3:1) de 6,08 $\mu\text{mol h}^{-1}$ por mg de proteína.	Fishman e Cogan (2003)
	<i>Pseudomonas sp</i>	Adsorção/Celite	Pré-tratamento/ 20 min	Aumento na atividade de transesterificação (acetato de vinila e 1-feniletanol 3:1) de 2462 $\mu\text{mol h}^{-1}$ por mg de proteína.	
	Pancreática suína (PPL)			Aumento na atividade de transesterificação (acetato de vinila e 1-feniletanol 3:1) de 3,59 $\mu\text{mol h}^{-1}$ por mg de proteína.	
(<i>R</i>)-(-)-2-octanol e metanol	<i>Rhizopus javanicus</i> (Lipase F-AP)	Matriz Sol-gel/Aprisionamento	Simultâneo/ 30 s	Aumento da atividade de esterificação (ácido <i>n</i> -butírico e glicidol 1:1) enantiosseletiva para o (<i>R</i>)-(+)-glicidol, de 1,24 vezes.	Furukawa et al. (2002)
Azeite de oliva	<i>Pseudomonas spp.</i> (AK)	Interface líquido-gasoso (bolhas)	Simultâneo/ N ^{le}	Aumento de 4,4 vezes na atividade de interesterificação (caprilato de etila 100 mg e trioleína 78 mg).	Yilmaz (2002a)
(<i>R,S</i>)-Acetato de 1-fenil-butila	<i>Candida antarctica</i> (CALB) - Novozym 435.	Enzima livre (comercial)	Simultâneo/ N ^{le}	Diminuição da atividade de transesterificação ((<i>R,S</i>)-acetato de 1-fenil-butila e (<i>R,S</i>)-1-fenil-propanamina 1:1), porém ocorreu aumento de 18,6 vezes na enantiosseletividade	García-Urdiales et al. (2001)

a: CLEA: Agregados enzimáticos reticulados, do inglês “*cross-linked enzyme aggregates*”; b: NPMfmgd: Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com melamina glutaraldeído tipo dendrímero; c: NKA: Resina de poliestireno hidrofóbica macroporosa, com tamanho de partícula de 300 a 1250 μm , área específica de 570 a 590 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ e diâmetro de poro de 200 a 220 Å; d: PEG: Polietilenoglicol; e: NI: Não Informado; f: PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados.

Os agentes de *bioimprinting* mais utilizados (Tabela 1) são os ácidos graxos, e dentre eles, o ácido oleico, com massas adicionadas na faixa de 2,4 μmol (utilizado por Sánchez et al. (2021), equivalente a 0,3 mmol de ácido oleico para cada g de extrato bruto liofilizado) a 500 mmol (KAHVECI e XU, 2012) equivalente a 50 mmol L⁻¹. Os ácidos graxos geralmente são solubilizados em etanol, *i*-propanol, *t*-butanol e *n*-butanol, ou diretamente adicionados ao tampão de solubilização da lipase, antes ou durante o processo de imobilização. Uma forma de utilização incomum, quando comparada às observadas nos artigos encontrados, foi a aplicação do ácido oleico simultaneamente à imobilização da lipase em biorreator de membrana (Hilal et al. 2004), com o objetivo de aumentar a atividade catalítica da lipase imobilizada em agregados enzimáticos reticulados (do inglês *cross-linked enzyme aggregates* – CLEAs). O ácido oleico foi usado durante a formação dos CLEAs nos poros da membrana, nos quais estavam adsorvidos os agregados. Houve um aumento pequeno de 4% na atividade de esterificação na reação entre o ácido oleico e o *n*-butanol.

No pré-tratamento (Tabela 1), foram descritos períodos de incubação entre 10 e 60 min; quando o *bioimprinting* foi realizado simultaneamente à imobilização, o tempo de incubação aumentou para 6 h, o que é justificável pela necessidade conjunta de imobilização da enzima (SÁNCHEZ et al., 2021). Também foram descritas utilizações de agitação orbital ou mecânica e foram empregadas temperatura na faixa entre 4 °C e temperatura ambiente. O tempo de tratamento do *bioimprinting* aparentemente é relevante apenas nos processos de pré-tratamento. Nos processos de formação de matrizes sol-gel, o tempo de exposição da lipase ao ácido oleico é o mesmo observado para a formação da matriz (WEISER et al., 2016; WANG et al., 2014; HELLNER et al., 2011).

Adicionalmente pode ser destacada a variedade das aplicações dos derivados imobilizados obtidos com o *bioimprinting* com o ácido oleico, tendo sido utilizados em reações de hidrólise de triglicerídeos do óleo de peixe bruto, visando ao aumento da concentração de ácidos graxos poli-insaturados (SAMPATH et al., 2018; YAN et al., 2010), em biorreatores, para esterificação do ácido oleico com *n*-butanol (HILAL et al., 2004), no tratamento de células inteiras contendo lipases, para aumento da atividade de esterificação na reação entre ácido oleico e metanol (CHEN et al., 2012).

Apenas um trabalho (Tabela 1) relatou a resolução cinética de racematos por transesterificação usando (*R,S*)-2-octanol e acetato de vinila (Liu et al., 2013), usando a lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada por adsorção hidrofóbica na resina macroporosa D4020. O pré-tratamento foi realizado incubação da solução enzimática com mistura de Triton X-100 e isopropanol, juntamente com 0,1 mmol de (*R*)-2-octanol, por 30 min, à temperatura ambiente. Após a imobilização, o imobilizado foi liofilizado e lavado com solvente anidro para remoção do surfactante e do (*R*)-2-octanol. Foi relatado um aumento de 2,75 vezes no coeficiente de enantiosseletividade ($E=80$ para $E=220$) e aumento na produtividade da reação de 8,9 vezes, ou seja, aumento de $40 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ para $354 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$. Por dicroísmo circular, verificou-se que houve um decaimento da quantidade de α -hélices e um aumento tanto de β -folhas quanto de β -curvas. Os autores justificaram estas alterações estruturais pelo decréscimo das ligações de hidrogênio intermoleculares entre as moléculas de água e a superfície da enzima, resultando no rearranjo conformacional destas estruturas. Esta nova disposição espacial deslocou a estrutura *lid*, expondo o sítio catalítico da lipase ao meio reacional, favorecendo a atividade catalítica e, conseqüentemente, a enantiosseletividade da lipase.

3.3.1.2 Produtos, análogos aos produtos e inibidores

Os artigos que versam sobre a utilização de produtos, análogos aos produtos e inibidores como agentes de *bioimprinting* (Tabela 2) são bem menos numerosos do que os que relatam substratos, sendo aplicados como agentes de pré ou pós-tratamento. Observa-se que, no caso da utilização de produtos (DIAZ-VIDAL et al., 2019; KOTER e CEYNOWA, 2003), as reações avaliadas foram de síntese (esterificação e transesterificação) em solventes orgânicos.

As abordagens utilizando os produtos da reação como agentes de *bioimprinting* são mais difíceis para serem avaliadas e comparadas entre si pelo fato de que a sua aplicação é para uma reação específica. Desta forma não é possível encontrar-se um agente que possa atuar como ativador em diferentes reações, como é o caso do ácido oleico, por exemplo, agente mais usado em pré-tratamentos e pós-tratamentos (Tabela 2).

Um exemplo da especificidade do produto como agente de *bioimprinting* é a produção do Olvanil, nome comercial para a *N*-vaniloleamida (Tabela 2) (DIAZ-VIDAL et al., 2019), proveniente da reação de esterificação entre a vanilamina e o ácido oleico. O pré-tratamento foi aplicado antes da formação de agregados enzimáticos reticulados (*cross-linked enzyme aggregates* – CLEAs) da lipase de *Candida rugosa* (CRL), incubada previamente com Olvanil por 15 min, a 30 °C, sob agitação de 450 rpm. Houve aumento na produção do produto de 1,6 vezes em relação ao controle sem *bioimprinting* (6,8 g L⁻¹ para 10,7 g L⁻¹).

Já a utilização de um conhecido inibidor de lipases como agente de *bioimprinting*, Orlistat ((*S*)-2-formylamino-4-methyl-pentanoic acid (*S*)-1-[[[(2*S*,3*S*)-3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl]-methyl]-dodecyl ester) foi estudada por Yilmaz (2003). Para o *bioimprinting*, 100 mg de lipase foram dissolvidos em 5 mL de tampão Tris-HCl, pH 7,5 e adicionados 5 mL de solução contendo 60 mg de Orlistat dissolvido em 5 mL de clorofórmio, incubados por 30 min à temperatura ambiente sob constante agitação e imediatamente liofilizada. Então, o material seco foi lavado com clorofórmio para remoção do agente de *bioimprinting* e imediatamente utilizado. Observou-se que a lipase pancreática suína (PPL) foi completamente inibida pelo composto após o *bioimprinting*. Por outro lado, as lipases de *Pseudomonas fluorescens* (PFL), *Chromobacterium viscosum* (CVL), lipase AK de *P. fluorescens*, AY-30 e lipase PS de *Burkholderia cepacia* apresentaram em média aumento de 30% de atividade de interesterificação na reação entre o caprilato de etila com trioleína em *n*-hexano.

Tabela 2: Produtos, análogos aos produtos e inibidores usados isoladamente ou em misturas como agentes de *bioimprinting* de lipases

Agente de <i>bioimprinting</i> (melhor)	Fonte de Lipase	Suporte/ Forma de imobilização	Tipo de <i>bioimprinting</i>/ Tempo de incubação	Principais resultados	Referência
N-vaniloleamida (Olvanil)	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	CLEA ^a	Pré-tratamento/ 15 min	Aumento na atividade de esterificação de 1,6 vezes (vanilamina e ácido oleico 1:1)	Diaz-Vidal et al. (2019)
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-(-)-trans-2-fenil-1-ciclohexanol	<i>Pseudomonas</i> sp.	Membrana bifuncional de poliamida/Ligações covalentes	Pré-tratamento/ NI ^b	Aumento da atividade de transesterificação (acetato de vinila e (<i>R</i> - <i>S</i>)-2-fenil-ciclohexanol 10:1) com aumento do excesso enantiomérico do produto para 98%,	Koter e Ceynowa (2003)
Orlistat	Pancreática suína (PPL)	Enzima livre	Pré-tratamento/ 30 min	Inibição completa da atividade enzimática.	Yilmaz (2003)
	OS			Aumento de 33% na atividade de interesterificação (trioleína 78 mg e caprilato de etila 100 mg).	
	AY-30			Aumento de 32% na atividade de interesterificação (trioleína 78 mg e caprilato de etila 100 mg).	
	AK			Aumento de 36% na atividade de interesterificação (trioleína 78 mg e caprilato de etila 100 mg).	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFL)			Aumento de 28% na atividade de interesterificação (trioleína 78 mg e caprilato de etila 100 mg).	
	<i>Chromobacterium viscosum</i> (CVL)			Aumento de 40% na atividade de interesterificação (trioleína 78 mg e caprilato de etila 100 mg).	

a: CLEA: Agregados enzimáticos reticulados, do inglês “cross-linked enzyme aggregates”; b: NI: Não Informado

3.3.1.3 Surfactantes e aditivos

Na maioria dos estudos (Tabela 3) foi realizado o pré-tratamento das lipases, seguido por precipitação por solventes orgânicos, liofilização ou processos de imobilização. Observa-se também que o tempo de exposição das lipases nos processos de *bioimprinting* é menor (1 a 30 min) comparado aos utilizados no pré-tratamento com ácidos graxos (Tabela 1, 10 a 60 min).

Dentre os surfactantes utilizados como agentes de *bioimprinting* (Tabela 3), o que apresentou os melhores resultados para a maioria das lipases analisadas foi o *N*-octil- β -D-glicopiranosídeo (*n*-OG), tendo apresentado os melhores efeitos quando utilizado nas concentrações acima de sua concentração micelar crítica (CMC), 10 mmol L⁻¹ e 50 mmol L⁻¹ para diferentes lipases estudadas (MINGARRO et al., 1995).

Em alguns casos, foram variadas as concentrações do surfactante gerando diferentes tratamentos, nos quais foram observados resultados diferentes (MUKHERJEE e GUPTA, 2015). O pré-tratamento da lipase de *Candida rugosa* (CRL) com 40 mmol L⁻¹ de *n*-OG acarretou aumento de 7,2 vezes na atividade de transesterificação da reação entre o butirato de etila e *n*-butanol em *n*-hexano. O tratamento de CRL com 10 mmol L⁻¹ de *n*-OG favoreceu a resolução cinética do (*R,S*)-1-feniletanol por transesterificação com acetato de vinila em *n*-hexano, com conversão de 34% e excesso enantiomérico de substrato ($ee_{(R)}$) de 69%, e coeficiente de enantiosseletividade, *E*, de 63; para a resolução cinética usando a lipase de *Thermomyces lanuginosa* (TLL), o melhor resultado foi verificado com a utilização de 40 mmol L⁻¹ de *n*-OG, com conversão de 36%, $ee_{(R)}$ de 99% e *E* de 340. Neste mesmo trabalho, podem ser destacados os resultados obtidos com o tratamento de TLL com brometo de hexadecil trimetil amônio (CTAB) 0,05%, acarretando aumento de 11,4% na atividade de transesterificação,

Tabela 3: Surfactantes e aditivos usados isoladamente ou em misturas como agentes de *bioimprinting* de lipases

Agente de <i>bioimprinting</i> (melhor)	Fonte de Lipase	Suporte/ Forma de imobilização	Tipo de <i>bioimprinting</i> / Tempo de incubação	Principais resultados	Referência
Triton X-100	<i>Burkholderia cepacia</i> (BCL) comercial	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ /Precipitação	Pré-tratamento/60 min	Aumento de 3,3 vezes no rendimento da atividade de esterificação (óleo de soja e etanol 1:4).	Yang e Zhang (2019)
<i>n</i> -OG e etanol	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Enzima livre	Pré-tratamento/ 2 min	Aumento da conversão na atividade de esterificação (óleo de soja e etanol 1:4) de 73 para 98%	Mukherjee e Gupta (2016a)
<i>n</i> -OG ^a	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ /Precipitação	Pré-tratamento/ 30 min	Aumento da atividade de esterificação (óleo de soja e etanol 1:4) de 4,7 para 23,3 $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg proteína ⁻¹ com 99% de conversão em menos de 5 h.	Mukherjee e Gupta (2016b)
Tween 80	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Lipase AK)			Aumento do rendimento da reação de resolução do (R-S)-1-feniletanol de 831%, aumento do <i>ee</i> _(R) de 95,2% para 99,8%, porém com diminuição na conversão de 25,8%	
PEG ^b 400	<i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS)	Nanofibra álcool polivinílico (PVA)/Aprisionamento	Simultâneo/ 25 min	Aumento do rendimento da reação de resolução do (R-S)-1-feniletanol de 1922%, aumento do <i>ee</i> _(R) de 99,1% para 99,7%, e conversão de 0,5%	Weiser et al. (2016)
PEG ^b 400	<i>Candida antarctica</i> (CALB)			Aumento do rendimento da reação de resolução do (R-S)-1-feniletanol de 5018%, aumento do <i>ee</i> _(R) de 98,7% para 99,9%, e conversão de 13%	
BRIJ	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Matriz Sol-gel/Aprisionamento	Simultâneo/ 10 min	Diminuição da atividade de específica em sistemas multi-substratos de 48 para 22 U g ⁻¹ , porém aumento de <i>E</i> de 100	Hellner et al. (2011)
Lecitina	Pancreática suína (PPL)	Enzima livre	Pré-tratamento/ 15 min	Aumento de 4,2 vezes na atividade de interesterificação (caprilato de etila 100 mg e trioleína 78 mg).	Yilmaz (2002b)
<i>n</i> -OG	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFL)	CM-Sephadex/ Adsorção	Pré-tratamento/ 5 min	Aumento de 4,1 vezes na atividade de interesterificação (caprilato de etila 100 mg e trioleína 78 mg).	Yilmaz (2002c)
<i>n</i> -OG	Pancreática suína (PPL)	Terra diatomácea/ Adsorção	Pré-tratamento/ 5 min	Aumento de 4,2% na atividade de transesterificação (ácido oleico e diferentes álcoois 1:1).	González-Navarro e Braco (1998)
<i>n</i> -OG	<i>Rhizopus niveus</i> (RNL)	Enzima livre	Pré-tratamento/ 5 min	Aumento de 46,7 vezes na atividade de esterificação (ácido oleico e diferentes álcoois 1:1).	González e Braco (1997)
Fosfatidilcolina de ovo:Triton X-100 (1:4)	<i>Humicola Zanuginosa</i> (HLL)	Enzima livre	Pré-tratamento/ 2 min	Aumento de 44,6% na atividade de transesterificação (caprilato de butila e 1-hexanol 1:1).	Mingarro et al. (1995)
	Pancreática suína (ppPLA2)	Enzima livre	Pré-tratamento/ 2 min	Aumento de 529% na atividade de esterificação (caprilato de butila e 1-hexanol 1:1). Fator de ativação ^d de 70% na hidrólise da fosfatidilcolina do ovo	

a: *n*-OG: *N*-octil- β -D-glicopiranosídeo; b: PEG: Polietilenoglicol; c: BRIJ éter dodecílico de polietilenoglicol; d: Fator de ativação: razão entre a taxa de reação inicial em meio orgânico da enzima com *bioimprinting* em relação à enzima sem *bioimprinting*.

Outra observação (Tabela 3) é que o processo de *bioimprinting* pode ser realizado simultaneamente ao processo de imobilização, devido à facilidade de disponibilização do agente molde no meio reacional que forma a estrutura de aprisionamento da lipase. Além disso, o próprio componente da matriz sol-gel pode exercer efeito de agente de *bioimprinting* como observado no trabalho de Yang et al. (2010), no qual os precursores silanos parcialmente hidrolisados surtiram efeitos como agentes de *bioimprinting* superiores aos efeitos observados com ácido láurico.

Em resumo, a partir dos resultados encontrados na literatura, verifica-se que os tratamentos de *bioimprinting* podem ser alternativas para aumento da atividade de derivados imobilizados. A escolha da abordagem ou do tipo de agente de *bioimprinting* não pode ser generalizada, pois cada lipase comporta-se diferentemente, dependendo dos tipos de tratamento e de imobilização. O *bioimprinting* pode ser útil na intensificação de processos, uma tendência atual em processos biocatalíticos (BOLIVAR et al., 2022), particularmente considerando-se que a outra alternativa, o aumento da carga proteica em relação a um suporte, não irá necessariamente aumentar a atividade catalítica do derivado imobilizado proporcionalmente. Isto é decorrente da saturação do suporte, com formação de multicamadas de moléculas de enzima, de interferência na formação de nanofibras, no caso de matrizes sol-gel (WEISER et al., 2016), e formação de dímeros e aglomerados a lipases covalentemente imobilizadas (ALNOCH et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Fermentativa Enzimática (LTFE) do Departamento de Bioquímica, e no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química, ambos da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O fluxograma da estratégia do trabalho é apresentado na Figura 5. O início ocorreu pela superexpressão e purificação, assim como os ensaios de caracterização de LipC12 (atividade em meio aquoso e quantificação da concentração de proteína), destacando-se que esta etapa foi realizada sempre para cada novo lote de LipC12.

Na sequência, estudos de ativação de LipC12 livre por *bioimprinting* e aplicação de técnicas de imobilização, segundo metodologias já estabelecidas, foram realizados de forma separada. Com a obtenção de resultados reprodutíveis após o processo de imobilização (etapa necessária para padronização, já que esta técnica foi repetida a cada novo lote), partiu-se para a realização dos estudos de *bioimprinting* somados à imobilização.

Com o início dos estudos de diferentes estratégias de *bioimprinting*, esta técnica foi aplicada aos derivados imobilizados via adsorção (Accurel MP-1000), como pré-tratamento ou pós-tratamento à imobilização, assim como aos derivados imobilizados obtidos através de ligação covalente (Immobead 150-P), como pré-tratamento, pós-tratamento em meio aquoso e pós-tratamento em meio orgânico. Além disso, foram utilizados derivados imobilizados em Immobead 150-P utilizando o extrato bruto de LipC12 livre de células, que também foram submetidos ao pré ou pós-tratamento por *bioimprinting*.

Após a observação dos melhores resultados de atividade dos derivados imobilizados, por meio da Determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico, os melhores derivados imobilizados de cada tratamento foram utilizados na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol.

O derivado imobilizado que apresentou maior atividade na reação de esterificação foi escolhido para aplicação do teste de reuso após 10 ciclos na reação de hidrólise em meio orgânico, a fim de verificar a estabilidade após o processo de *bioimprinting*.

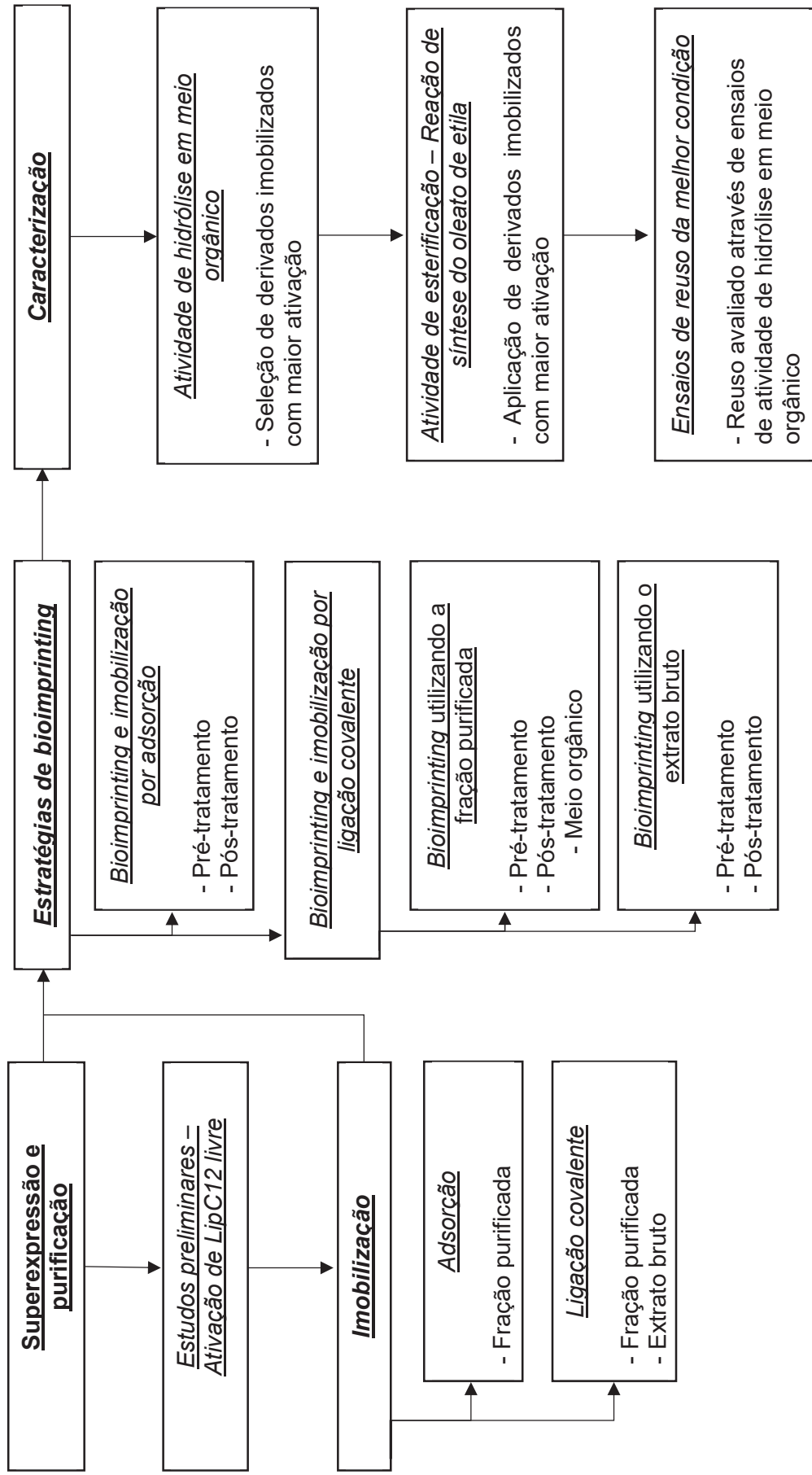


Figura 5: Fluxograma da estratégia deste trabalho.

4.1 MATERIAIS

Foram utilizados os meios de cultivo Luria Bertani (LB) e LA, composto por meio LB com adição de ágar (15 g L^{-1}) (KASVI, PR, Brasil). Para indução da expressão da lipase foi utilizado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (INVITROGEN LIFETECHNOLOGIES, USA). Para a purificação, foram utilizadas colunas de afinidade (HiTrap Chelating HP GE HEALTHCARE, Uppsala, Sweden). Cepas *E. coli* TOP10 (INVITROGEN, CA, USA) para armazenamento e BL21(DE3) (NOVAGEN, MI, USA) para expressão. Suportes para a imobilização: (I) Polipropileno Accurel MP – 1000 (MEMBRANA GMBH, Obernburg, Germany), com área de superfície de $55,985 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, densidade da partícula de $1,993 \text{ g cm}^3$, porosidade das partículas de 0,70 e tamanho das partículas $<1500 \mu\text{m}$; (II) resina acrílica com grupamentos oxirano, Immobead 150-P (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA), com tamanho das partículas entre 0,15 e 0,5 mm. Trietilamina, *n*-heptano, *n*-hexano (99,5%), *t*-butanol e tolueno adquiridos da VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil); etanol (99,5%), glicerina, ácido clorídrico, ácido acético, *i*-propanol, TWEEN 80, cloreto de potássio P.A. e cloreto de sódio P.A. adquiridos da SYNTH, (Diadema, SP, Brasil); Tris (hidroximetil) aminometano P.A. e imidazol P.A. da NEON QUÍMICA (São Paulo, SP, Brasil). Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), Coomassie R-250, trioleína (65%), ácido oleico (90%) e o antibiótico para cultivo de *E. coli* kanamicina (utilizada a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) adquiridos da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, USA). Todos os demais reagentes, como sais utilizados no preparo de soluções, surfactantes e substratos de reações apresentavam grau de pureza P.A.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Superexpressão e purificação de LipC12

A superexpressão e purificação de LipC12 foram feitas de acordo com Glogauer et al. (2011), com modificações. Células transformadas de *E. coli* BL21 (DE3) com plasmídeo pET28a-*lipC12* cultivadas em meio LB (800 mL) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ até DO_{600} de 0,6, seguindo-se a indução com adição de IPTG (concentração final de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Após adição do agente de indução, o cultivo foi incubado por

16 h a 20 °C, para posterior obtenção do *pellet* de células por centrifugação (10 000 × *g* por 10 min) à temperatura ambiente.

Os *pellets* de células foram ressolubilizados em 5 mL de tampão de lise composto por 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ de NaCl, 10 mmol L⁻¹ de imidazol, 10% (v/v) de glicerol, e lisado por ultrassom em banho de gelo (10 ciclos de pulsos de 15 s, 90 W, com intervalos de 15 s) utilizando sonicador (SONICATOR® XL 2020, Heat systems-Ultrasonics Inc., New Highway, Farmingdale, NY, EUA), gerando um extrato bruto (EB), que então foi centrifugado (15 000 × *g* por 15 m) a 4 °C para sedimentar os restos celulares e separação de LipC12 presente na fração solúvel.

Para a obtenção de LipC12 purificada foi utilizada uma coluna HiTrap HP Chelating (GE Healthcare, EUA), previamente carregada com Ni²⁺ e ambientada com três volumes de tampão de lise (50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ de NaCl, 1 mol L⁻¹ de imidazol). O extrato bruto então foi carregado na coluna e as proteínas foram eluídas com solução contendo diferentes concentrações de imidazol, formando um gradiente crescente, de 50, 100, 300 e 500 mmol L⁻¹.

As frações purificadas e o extrato bruto de LipC12 foram analisadas através de eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE), conforme descrito em 4.3.1

4.2.2 Agentes de *bioimprinting*

Foram testados agentes de *bioimprinting* que são relatados na literatura como ativadores de lipases: (1) ácido oleico nas massas 29,4 e 147 nmol, dissolvido em *t*-butanol, equivalentes em massa à razão LipC12:ácido oleico a 1:1 e 1:5 de LipC12, respectivamente; (2) solução aquosa de CTAB, 50 mmol mL⁻¹, utilizada pura ou e em misturas com ácido oleico, (3) solventes orgânicos (20% (v/v) em relação ao meio de incubação total): metanol, etanol absoluto, *t*-butanol, *n*-heptano e tolueno.

Com base na literatura (Tabela 1), o ácido oleico foi o ácido graxo mais utilizado como agente de *bioimprinting*, motivo pelo qual foi o escolhido nestes experimentos. Para a definição da massa de ácido oleico nos ensaios levou-se em consideração observações realizadas no início do trabalho (dados não mostrados), em que grandes concentrações de ácido oleico inibiram a atividade

lipolítica de LipC12 livre. Além disso, a baixa solubilidade do ácido oleico em água ($0,003 \text{ mg mL}^{-1}$ a 20° C) requer solubilização deste ácido em solvente orgânico, como o *t*-butanol, que atua como solvente e agente de ativação interfacial (Yan et al., 2009).

Em relação à massa de surfactante, utilizou-se massa de 50 mmol por mg de LipC12) conforme dados da literatura (Tabela 3) (WEISER, 2016; MUKHERJEE e GUPTA, 2016b; MUKHERJEE e GUPTA, 2016a).

Para a escolha dos solventes metanol, etanol, *t*-butanol, *n*-heptano e tolueno, foram considerados resultados de aumento da atividade de hidrólise da lipase livre após incubação, observados por Glogauer et al. (2011) e Madalozzo et al. (2015), utilizando soluções aquosas com 30% (v/v) destes solventes orgânicos. Além disso, levou-se em consideração os valores tabelados do logaritmo do coeficiente de partição do octanol em água ($\log P$), um parâmetro adotado para indicar a polaridade de solventes orgânicos (LAANE et al., 1987).

Os valores utilizados nos experimentos utilizando LipC12 purificada foram calculados proporcionalmente, ou seja, uma molécula de ácido oleico em relação a uma molécula de LipC12, e calculada a quantidade (nmol) das duas moléculas. Considerou-se 34.000 g para 1 mol de LipC12, calculada a partir da massa molecular de 34 kDa (GLOGAUER et al., 2011). Assim sendo, a cada 1 mg de LipC12 tem-se disponível 29,4 nmol de enzima. A proporção de ácido oleico (também em nmol) estudada foi 1 e 5, portanto, nos ensaios com adição de ácido oleico, foram utilizados 29,4 e 147 nmol por mg de LipC12, respectivamente.

A proporção de 1:1 (LipC12:ácido oleico) corresponde a 1 mg de proteína - equivalente a 29,4 nmol de LipC12 - e 1 mL da solução de ácido oleico contendo 29,4 nmol (obtida a partir da diluição de 58,82 μL da solução de ácido oleico $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ com 941,18 μL de *t*-butanol). Na proporção 1:5, foi utilizado 1 mg de proteína na fração purificada - equivalente a 29,4 nmol de LipC12 - e 1 mL da solução de ácido oleico contendo 147 nmol (obtida a partir da diluição de 291,1 μL da solução de ácido oleico $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ com 705,9 μL de *t*-butanol). Já para os casos em que foi adicionado CTAB, foi utilizado 4 mL da solução de LipC12 purificada contendo 1 mg de proteína e 1 mL da solução de CTAB (50 mmol mL^{-1}) resultando em 50 mmol de CTAB por mg de LipC12, e nos casos que foram avaliados CTAB e ácido oleico, foi adicionado 3 mL de solução de

LipC12 (mantendo a massa de 1 mg de LipC12), 1 mL da solução de ácido oleico (29,4 nmol ou 147 nmol de ácido oleico para a proporção LipC12:ácido oleico 1:1 ou 1:5 respectivamente) e 1 mL da solução de CTAB 50 mmol mL⁻¹ (mantendo a relação 50 mmol de CTAB por mg de LipC12).

Os agentes de *bioimprinting*, (1 mL da solução de *bioimprinting*) foram adicionados a 4 mL de solução de LipC12, para um volume final de 5 mL de solução na incubação de *bioimprinting*, ou seja, a massa de ácido oleico da condição AO1 equivale a adição de 29,4 nmol de ácido oleico em 5 mL de solução de incubação. Para efeitos de padronização, a massa de agente de *bioimprinting* utilizada e o nome utilizado para cada condição são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Soluções e solventes utilizados como agentes de *bioimprinting*

Agente de <i>bioimprinting</i>	Volume (mL)	Sigla
Ácido oleico 29,4 nmol em <i>t</i> -butanol	58,82 µL ^a	AO1
<i>t</i> -butanol	941,18 µL	
Ácido oleico 147 nmol em <i>t</i> -butanol	291,1 µL ^a	AO5
<i>t</i> -butanol	705,9 µL	
CTAB 50 mmol	1 mL ^b	CTAB
CTAB 50 mmol	1 mL ^b	CTAB- <i>t</i> -butanol
<i>t</i> -butanol	1 mL	
CTAB 50 mmol	1 mL ^b	CTAB-AO1
Ácido oleico 29,4 nmol em <i>t</i> -butanol	58,82 µL ^a	
<i>t</i> -butanol	941,18 µL	CTAB-AO5
CTAB 50 mmol	1 mL ^b	
Ácido oleico 147 nmol em <i>t</i> -butanol	291,1 µL ^a	CTAB-AO5
<i>t</i> -butanol	705,9 µL	
Metanol	1 mL	Metanol
Etanol absoluto	1 mL	Etanol
<i>t</i> -butanol	1 mL	<i>t</i> -butanol
<i>n</i> -heptano	1 mL	<i>n</i> -heptano
Tolueno	1 mL	Tolueno

Legenda: a: Solução de ácido oleico 1 µmol mL⁻¹ em *t*-butanol; b: Solução de CTAB 50 mmol mL⁻¹

4.2.3 Estudos preliminares – Ativação de LipC12 livre

Estes experimentos foram feitos com a finalidade de encontrar agentes de ativação de LipC12 livre que pudessem ser utilizados como agentes de *bioimprinting*, antes do processo de imobilização.

Em frascos Erlenmeyer de 25 mL, foram adicionados 4 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 contendo 1 mg de proteína e 1 mL de agente de *bioimprinting*. Os frascos foram incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Após a incubação, alíquotas das amostras foram transferidas ao vaso de reação do pHStat para medição da atividade de hidrólise, conforme descrito em 4.3.3. A atividade foi medida imediatamente após a incubação de cada amostra, uma vez que cada condição foi testada isoladamente. O controle foi feito incubando-se a solução de LipC12 nas mesmas condições dos ensaios, sem agente de *bioimprinting*.

Destaca-se que todos os experimentos foram conduzidos em duplicata. Isto é, cada condição testada foi realizada em duplicata desde o momento da incubação ou imobilização.

4.2.4 Ensaios de imobilização de LipC12 sem tratamento de *bioimprinting*

Foram utilizadas duas formas de imobilização de LipC12: adsorção em suporte Accurel MP-1000, e por ligação covalente, em Immobead 150-P, com protocolos otimizados anteriormente por Madalozzo et al. (2015).

4.2.4.1 Imobilização por adsorção em Accurel MP-1000

A imobilização de LipC12 por adsorção foi feita utilizando o polipropileno comercial Accurel MP-1000, com base na metodologia proposta por Al-Duri e Yong (2000). Visando remover o ar contido dentro das partículas, 0,1 g do suporte foram umedecidos com solução de etanol (70% em água, v/v) por pelo menos 30 min. Na sequência, o suporte foi lavado com água destilada durante filtragem e incubado em água destilada *overnight* para então ser filtrado em papel filtro Whatman n° 15 e utilizado na imobilização. A imobilização foi realizada em frascos Erlenmeyer de 25 mL, onde foram colocados 0,2 g de suporte, LipC12

dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, com carga de proteína de 10 mg g⁻¹ de Accurel MP-1000. O sistema (suporte e solução enzimática) foi incubado a 4 °C sob agitação orbital de 150 rpm, por 12 h. Após a incubação, o derivado imobilizado foi filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman n° 15 e seco a vácuo (500 mm Hg) em dessecador por cerca de 24 h a 4 °C.

4.2.4.2 Imobilização por ligação covalente em Immobead 150-P

Os processos de imobilização de LipC12 purificada e do extrato bruto via ligação covalente em suporte comercial Immobead 150-P foram baseados nas metodologias descritas por Madalozzo et al. (2015) e Knezevic et al. (2006). A imobilização foi realizada em frascos Erlenmeyer de 25 mL, onde foram colocados 0,1 g de suporte, LipC12 dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, (com carga de proteína de 10 mg g⁻¹ enzima:suporte para a fração purificada e 200 mg g⁻¹ enzima:suporte para o extrato bruto). O sistema (suporte e solução enzimática) foi incubado a 4 °C sob agitação orbital de 150 rpm, por 6 h. Após a incubação, o derivado imobilizado foi filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman n° 15 e seco a vácuo (500 mm Hg) em dessecador por cerca de 24 h a 4 °C.

4.2.5 Estratégias de *Bioimprinting*

A metodologia de *bioimprinting* utilizada foi baseada em Mukherjee e Gupta (2015), porém, a etapa de liofilização foi substituída pela filtragem e lavagem com *t*-butanol e secagem em dessecador. Diferentes estratégias de *bioimprinting* aplicadas conjuntamente à imobilização de LipC12 purificada ou em extrato bruto foram utilizadas de acordo com a forma de imobilização aplicada.

Para cada conjunto de testes, foram utilizados novos lotes de LipC12 (purificada ou extrato bruto). Nos experimentos de pré-tratamento, o *bioimprinting* em LipC12 sempre foi realizado em volume (variável de acordo com a concentração da solução de LipC12) suficiente para produção de 0,1 g de derivado imobilizado. Para os experimentos de pós-tratamento, foram produzidos, em média, 2 g de derivado imobilizado por vez. Em todos os casos,

o derivado imobilizado final foi imediatamente utilizado na reação de atividade de hidrólise em meio orgânico, e o excedente armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nos casos em que foi necessária a alteração da massa de suporte ou do derivado imobilizado, a massa de ácido oleico acompanhou proporcionalmente. Para efeito de padronização, os mesmos valores de ácido oleico foram utilizados em ensaios de *bioimprinting* como pós-tratamento da enzima purificada, e nos ensaios utilizando extrato bruto da solução enzimática.

Nos ensaios em que foi utilizado extrato bruto de LipC12, foram mantidas as massas de ácido oleico, ou seja, 29,4 nmol e 147 nmol por 5 mL do meio reacional contendo 200 mg de proteína, sendo que a carga de proteína foi de 200 mg por g de suporte. Com base nos resultados de densitometria, a massa de LipC12 disponível foi de 1728,72 nmol (29,4%) acarretando em razão mássica LipC12:ácido oleico de 1:11,76 e 1:58,8, para as adições de 29,4 e 147 nmol de ácido oleico, respectivamente.

A adição dos agentes de *bioimprinting* foi realizada de forma sequencial. Para a adição de ácido oleico, partiu-se de uma solução estoque do ácido em *t*-butanol na concentração de $1\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}$. Esta solução foi diluída com o mesmo álcool para a concentração desejada no experimento, no próprio frasco de ensaio. Para o CTAB, a solução aquosa estoque (50 mmol mL^{-1}) foi diretamente adicionada à solução de LipC12.

Para os experimentos de *bioimprinting* em meio orgânico, foi preparada solução de CTAB 50 mmol mL^{-1} em *n*-hexano, sob constante agitação magnética, com a adição de água gota a gota até a formação de micelas invertidas estáveis, momento em que a solução se tornou homogeneamente branca, opaca e com viscosidade maior que a solução inicial.

4.2.5.1 Bioimprinting combinado à imobilização por adsorção

Estes experimentos foram feitos com a fração purificada de LipC12 e o suporte utilizado foi o Accurel MP-1000. Foram estudados os efeitos do *bioimprinting* como pré-tratamento e pós-tratamento

4.2.5.1.1 *Bioimprinting* como pré-tratamento

Para o *bioimprinting* antes da imobilização, foram adicionados 4 mL da solução enzimática 0,2 mg mL⁻¹ (para manter a proporção LipC12: suporte em 10 mg g⁻¹), 1 mL de solução de *bioimprinting* (Tabela 4), incubando-se a mistura em agitador orbital, a 150 rpm, 4 °C por 15 min. Logo após a incubação, no mesmo frasco, foi adicionado 0,1 g de Accurel MP-1000, seguindo-se o procedimento descrito no item 4.2.4.1.

Após a imobilização, os derivados imobilizados foram lavados com 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, filtrados em papel filtro Whatman n °15 a vácuo e secos em dessecador a vácuo (-500 mm Hg) a 4 °C por aproximadamente 24 h. Em seguida, os derivados imobilizados foram lavados duas vezes com 5 mL de *t*-butanol e novamente secos em dessecador a vácuo por 24 h. Após a secagem, os derivados imobilizados foram transferidos para tubos Eppendorf e armazenados a -20 °C até determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico utilizando trioleína como substrato e o meio reacional composto por *n*-hexano, de acordo com o item 4.3.8.

4.2.5.1.2 *Bioimprinting* como pós-tratamento

Para o *bioimprinting* posterior à imobilização em Accurel MP-1000, foi conduzida a imobilização de LipC12 purificada, de acordo com item 4.2.4.2. Após a secagem do derivado, foram adicionados 0,1 g de derivado imobilizado a frasco Erlenmeyer contendo 4 mL de solução Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, 1 mL de solução de *bioimprinting* (Tabela 4), e incubado em agitador orbital, a 150 rpm, 4 °C por 15 min.

Após a imobilização, os derivados imobilizados foram lavados com 10 mL de *t*-butanol para remoção dos agentes de *bioimprinting*, filtrados em papel filtro Whatman n °15 sob vácuo e secos em dessecador a vácuo a 4 °C por aproximadamente 24 h. Após a secagem, os derivados imobilizados foram transferidos para tubos Eppendorf e armazenados a -20 °C até determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico utilizando trioleína como substrato e o meio reacional composto por *n*-hexano (item 4.3.6).

4.2.5.2 Bioimprinting combinado à imobilização por ligação covalente

Estes experimentos foram feitos com LipC12 purificada e com o extrato bruto de LipC12 livre de células, produzidos conforme descrito no item 4.2. O suporte utilizado foi o Immobead 150-P. Foram realizados experimentos de *bioimprinting* como pré-tratamento, e pós-tratamento. Também foram feitos experimentos de pós-tratamento em meio orgânico, utilizando-se o derivado imobilizado obtido com a fração purificada de LipC12.

4.2.5.2.1 *Bioimprinting* utilizando a fração purificada de LipC12

Os ensaios de pré-tratamento foram conduzidos em Erlenmeyers de 25 mL com tampa, foram adicionados 4 mL da solução enzimática 0,2 mg mL⁻¹, 1 mL de solução de *bioimprinting*, como descrito em 4.2.3, incubando-se em agitador orbital, a 150 rpm, 4 °C por 15 min. Logo após a incubação, sem remoção do agente de *bioimprinting*, no mesmo frasco, foi adicionado 0,1 g de Immobead 150-P, seguindo-se a incubação por 6 h a 4 °C em agitador orbital, para imobilização da lipase.

Após a imobilização, os derivados imobilizados foram lavados com 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, filtrados em papel filtro Whatman n°15 a vácuo e secos em dessecador a vácuo (-500 mm Hg) a 4 °C por aproximadamente 24 h. Em seguida, os derivados imobilizados foram lavados duas vezes com 10 mL de *t*-butanol e novamente secos em dessecador por 24 h. Após a secagem, os derivados imobilizados foram transferidos para tubos Eppendorf e armazenados a 4 °C até determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico, utilizando trioleína como substrato e o meio reacional composto por *n*-hexano, segundo item 4.3.8.

Para o *bioimprinting* como pós-tratamento, LipC12 foi imobilizada no Immobead 150-P a partir da fração purificada, segundo Madalozzo et al. (2015), conforme descrito no item 4.2.4.2.

Após secagem, 0,1 g de derivado imobilizado foram adicionados a 4 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de solução de *bioimprinting* (Tabela 4), incubando-se em agitador orbital, a 150 rpm, 4 °C por 15 min. Em seguida, os derivados imobilizados foram lavados duas vezes com 5 mL de *t*-

butanol para remoção dos agentes de *bioimprinting* e novamente secos em dessecador, por 24 h. Após a secagem, os derivados imobilizados foram transferidos para tubos Eppendorf e armazenados a -20 °C até utilização nos ensaios de atividade.

Alternativamente, a solução tampão foi substituída por *n*-hexano nos ensaios de pós-tratamento. Para tanto, os ensaios foram feitos substituindo-se a solução tampão por 4 mL da solução *n*-hexano como meio para o *bioimprinting*. Adicionou-se 0,1 g do derivado imobilizado, 1 mL de solução de *bioimprinting* (Tabela 4), e incubou-se em agitador orbital, a 150 rpm, 4 °C por 15 min e secagem como descrito acima.

4.2.5.2.2 *Bioimprinting* utilizando o extrato bruto de LipC12

Estes experimentos foram feitos com imobilização de LipC12 em Immobead 150-P diretamente do extrato bruto livre de células, preparado como descrito no item 4.2. Nestes experimentos, foram realizados o pré-tratamento de LipC12 livre e de pós-tratamento do derivado imobilizado.

Os ensaios de pré-tratamento e pós-tratamento foram conduzidos de forma semelhante ao descrito no item 4.2.5.2.1, porém, aumentando-se a carga de proteína de 10 para 200 mg g⁻¹ de suporte. Nesta variação da metodologia optou-se por não realizar os experimentos de pós-tratamento em meio orgânico, considerando que esta variação da metodologia não produziu bons resultados em experimentos com LipC12 purificada.

4.2.6 Reutilização de LipC12 imobilizada em reações de hidrólise em meio orgânico

O estudo de reutilização em vários ciclos de reação foi aplicado por meio da determinação hidrolítica em meio orgânico (4.3.6), realizado com o derivado imobilizado do extrato bruto pré-tratado com AO5 (LipC12:ácido oleico 1:5). Após cada ciclo, os derivados imobilizados foram lavados com 2 volumes de 5 mL de *n*-hexano durante a filtração a vácuo, recuperados e secos em dessecador a vácuo por 16 h a 4 °C. Após este período, os preparados imobilizados foram

submetidos a um novo ciclo de reação. As conversões foram expressas em percentual da conversão absoluta obtida em cada ciclo.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Eletroforese SDS-PAGE

As frações purificadas e o extrato bruto de LipC12 foram analisadas através de eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE), realizada em gel de poliacrilamida como descrito por Laemmli (1970). O gel foi constituído por uma fração denominada “gel de empilhamento” com 5% de poliacrilamida (m/v) e a fração “gel de separação” com 12% de poliacrilamida (m/v). O preparo das amostras foi realizado pelo aquecimento das amostras a 100 °C por 5 min, e que foram então submetidas à eletroforese. As proteínas contidas no gel foram coradas com azul brilhante de Coomassie R-250 0,05% (m/v) por 30 min, descoradas com solução de metanol:ácido acético:água (5:1:4, v:v:v) por 60 min. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA). As corridas foram realizadas por pelo menos 60 min, sob voltagem constante de 150 V.

4.3.2 Densitometria SDS-PAGE

Para determinar-se a concentração relativa de LipC12 no extrato bruto, foi feita a análise por densitometria do gel SDS-PAGE através do Software *LabWorks Image Acquisition and Analysis 4.0* (UVP *BioImaging Systems*, Upland, CA, USA), em gel previamente preparado com a aplicação do marcador molecular e diluições do extrato bruto (diluições de 200x, 100x, 50x, 10x e 1x).

4.3.3 Determinação da atividade de LipC12 por método titulométrico

Esta metodologia, proposta por Stuer et al. (1986), baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos

triacilglicerídeos. A enzima (livre ou imobilizada) é colocada em um recipiente contendo o substrato emulsificado, com agitação e temperatura controlada. A emulsão é preparada através da mistura de água destilada, Tris-HCl (2,5 mmol L⁻¹, pH 7,0), CaCl₂ (2 mmol L⁻¹), NaCl (150 mmol L⁻¹), goma arábica (3%, m/v) e 67 mmol L⁻¹ de substrato (tributirina, tricaprilina ou trioleína) (TISS et al., 2001). Em seguida, a mistura foi emulsionada em um liquidificador Arno Optimix (Arno, São Paulo, Brasil) por 15 min. Para cada ensaio, 20 mL de emulsão foram adicionados ao vaso de reação termostatizado, com agitação magnética ao nível 6 de indicador de velocidade do equipamento.

A atividade de lipase é medida através da quantidade de NaOH (0,05 mol L⁻¹) adicionada pelo titulador automático pHStat (Metrohm Ti-Touch 916, Herisau, Suíça) para titular os ácidos graxos liberados durante a reação de hidrólise. O pH dos ensaios foi mantido em 7,0 e a reação, realizada a 37 °C, foi acompanhada durante 5 min. A atividade de hidrólise foi calculada de acordo com Equação 1.

$$A = \frac{dV}{dt} x [NaOH] x f x F_{pH} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

dV/dt : velocidade inicial da reação, calculada pelo consumo de NaOH na titulação, em mL min⁻¹;

[NaOH]: concentração de NaOH em μmol mL⁻¹;

f: fator de correção da concentração de NaOH;

F_{pH} : fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial do ácido oleico, que possui valor de pKa de 6,8.

Já o valor de F_{pH} foi calculado de acordo com a Equação 2, considerando o pH do ensaio (7,0).

$$F_{pH} = \frac{1+10^{(pH-pK)}}{10^{(pH-pKa)}} \quad \text{Equação 2}$$

A atividade de hidrólise foi expressa como unidade de atividade por miligrama de proteína ($U\ mg^{-1}$) ou unidades de atividade por grama de suporte ($U\ g^{-1}$). Uma unidade de atividade (U) representa a quantidade de enzima que promove a liberação de $1\ \mu\text{mol}$ de ácido graxo por min, nas condições utilizadas no ensaio.

4.3.4 Quantificação do teor de proteínas

A concentração de proteínas do extrato enzimático purificado e não purificado foi determinada através do método de Smith et al. (1985) ou método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando o kit “Pierce BCA Protein Assay” (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) como padrão.

4.3.5 Cálculo da eficiência de imobilização e retenção da atividade

Para todos os experimentos de imobilização, com ou sem *bioimprinting*, e para diferentes suportes e métodos de imobilização, foram calculados os parâmetros eficiência de imobilização (EI) e retenção de atividade dos imobilizados a partir do decréscimo da concentração de proteínas no sobrenadante da imobilização. A atividade dos sobrenadantes de imobilização foi determinada como descrito no item 4.3.3, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método BCA (4.3.4).

A eficiência de imobilização (EI) foi calculada de acordo com a Equação 3. Já a retenção da atividade (R) dos preparados imobilizados foi determinada pela atividade de hidrólise de LipC12 livre em meio orgânico com trioleína como substrato (4.3.6), através da Equação 4, comparando-se a atividade teórica, obtida através do balanço de massa expresso em atividade ($U\ g^{-1}$ de suporte), com a diferença de massa de proteína encontrada do sobrenadante no início e no fim do processo de imobilização, calculada pela Equação 5 (YADAV e JADHAV, 2005; MADALOZZO et al., 2015; SANTOS, 2021).

$$EI = \frac{(m_i - m_f) \times 100}{m_i} \quad \text{Equação 3}$$

$$R = \frac{A_o \times 100}{A_t} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

m_i : Massa inicial total no sobrenadante, antes da imobilização (U);

m_f : Massa final total no sobrenadante após a imobilização (U);

A_o : Atividade de hidrólise do imobilizado (U g⁻¹) determinada em meio orgânico;

A_t : Atividade teórica do imobilizado em meio orgânico (U g⁻¹), calculada conforme a Equação 5:

$$A_t = (m_{PI} - m_{PF}) \times A_{ESPorg} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

m_{PI} : massa de proteína (mg) originalmente da solução enzimática (sobrenadante) antes da imobilização (10 mg de LipC12 por g de suporte);

m_{PF} : massa de proteína (mg) que permaneceu no sobrenadante ao final da imobilização, calculada através da EI;

A_{ESPorg} : atividade de hidrólise específica da enzima livre (U mg⁻¹ de proteína), foi medida em meio orgânico contra a trioleína, utilizando 100 µL de solução de LipC12 purificada (0,66 mg mL⁻¹), apresentando atividade de 45,6 U mg⁻¹.

4.3.6 Determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico

O procedimento de hidrólise em meio orgânico utilizado foi o mesmo empregado por Madalozzo et al. (2015). A reação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 25 mL e o meio reacional composto de 4,6 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ de trioleína (65%), 2% (v/v) de água destilada (100 µL) e aproximadamente 20 mg da lipase imobilizada. Quando a atividade da lipase livre foi medida, ao invés da adição de 2% de água destilada (100 µL), foram adicionados 100 µL da enzima diluída em tampão (Tris HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5). A mistura foi mantida em agitador orbital a 180 rpm a 40 °C e a reação foi acompanhada por até 25 min pela retirada de alíquotas de 100 µL do meio

reacional para dosagem de ácidos graxos livres segundo método de Lowry-Tinsley, descrito no item 4.3.8.

Uma unidade de atividade (U) é a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de ácido graxo por min, nas condições utilizadas no ensaio.

4.3.7 Determinação da atividade de esterificação

O procedimento foi realizado de acordo descrito por Madalozzo et al. (2015). A reação de síntese do oleato de etila foi utilizada como reação padrão. O meio reacional (5 mL) foi composto de *n*-hexano, 70 mmol L^{-1} de ácido oleico e 210 mmol L^{-1} de etanol tendo sido utilizada razão molar ácido oleico:etanol de 1:3.

A reação teve início com a adição da enzima imobilizada (50 a 150 mg) e a mistura foi mantida em agitador orbital a 180 rpm e 40 °C. A reação foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo pela retirada de alíquotas de 100 μL do meio reacional, que foram analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual (4.3.8). A conversão em éster foi calculada a partir do consumo de ácidos graxos do meio reacional, cuja dosagem foi feita pelo método de Lowry-Tinsley (4.3.8).

4.3.8 Determinação dos ácidos graxos por método colorimétrico

O método de Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico nos meios reacionais de hidrólise da trioleína e síntese do oleato de etila em *n*-hexano. Este método mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos livres solúveis em fase orgânica. A concentração de ácido graxo no meio foi calculada por curvas de calibração feita com o ácido oleico (na faixa de 5 e 160 mmol), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio.

Para cada ensaio, foram adicionados 100 μL da amostra a ser analisada em tubos Eppendorf contendo 1150 μL de tolueno e 250 μL do reativo de cor, que consistiu em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%, m/v), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex (agitador de tubos) durante 40 s. Em seguida, a fase orgânica foi removida com

pipeta Pasteur e sua absorvância foi medida em a 715 nm em espectrofotômetro modelo UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

4.3.9 Tratamento estatístico dos dados

Os valores apresentados nas figuras e tabelas deste trabalho correspondem às médias dos resultados, em duplicata, seguidas do desvio padrão da média, calculado pela Equação 9.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x_M)^2}{n-1}} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

S é o desvio padrão da média; x_i é o valor de cada resultado individual (x_1, x_2, x_3); x_M é a média aritmética dos valores x_i e n é o número de amostras.

Para comparar os resultados, foi aplicado o teste t , com o auxílio das ferramentas de análise do Excel, com nível de significância de 5%. Assim, um valor de $p > 0,05$ significa que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média dos resultados e $p < 0,05$ significa que houve diferença estatisticamente significativa entre a média comparadas.

5 RESULTADOS

5.1 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LipC12

As frações obtidas dos extratos brutos e das frações purificadas de LipC12 foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 6), observando-se a banda maior de proteínas na fração purificada (linha G no gel), correspondente a uma massa molecular de 34 kDa, similar à encontrada por Glogauer et al. (2011). Os valores encontrados para as frações de LipC12 purificadas foram de 1948 ± 88 U mg^{-1} de atividade hidrolítica e $2,3 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas. Estes valores são similares aos encontrados por Glogauer et al. (2011) e Madalozzo et al. (2015) para a fração purificada da expressão de LipC12.

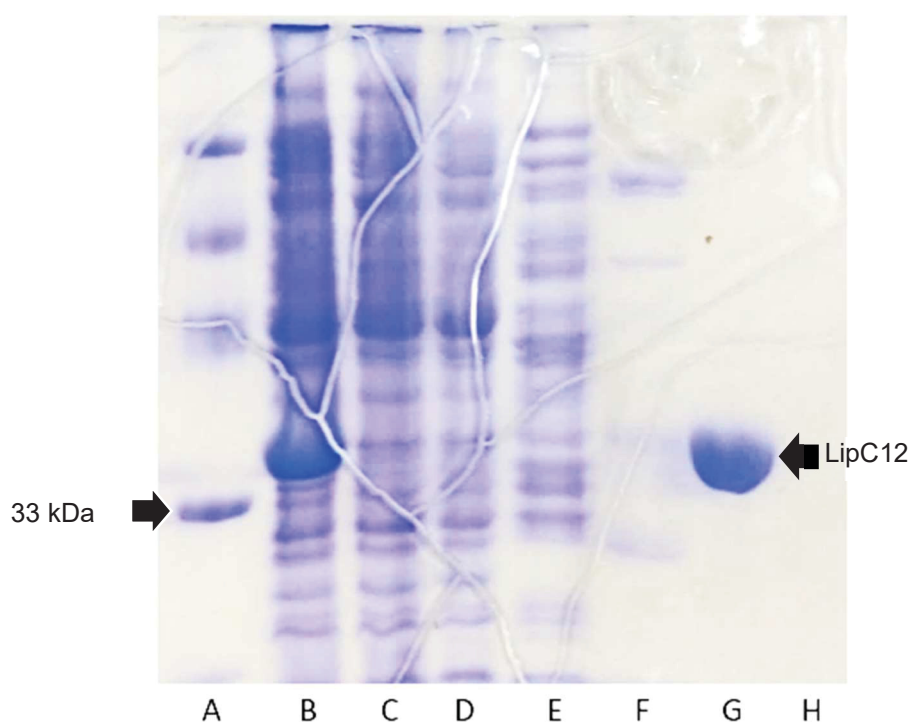


Figura 6: SDS-PAGE com as frações purificadas de LipC12.

Legenda: A: Marcadores moleculares; LipC12: B: Extrato bruto; C: Eluição da aplicação do extrato bruto na coluna; Frações eluídas da coluna HiTrap HP Chelating (GE Healthcare, EUA), gradiente de concentração de imidazol. D: 10 mmol L^{-1} ; E: 50 mmol L^{-1} ; F: 100 mmol L^{-1} ; G: 300 mmol L^{-1} ; H: 500 mmol L^{-1} .

O extrato bruto de LipC12, utilizado nos experimentos descritos no item 4.2.5.2.2, apresentou 2774 ± 139 U mg^{-1} de atividade hidrolítica contra trioleína e $14,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína. O extrato bruto também foi analisado por SDS-PAGE

para quantificação do teor de LipC12 relativo ao teor total de proteínas presente em solução, através de análise de densitometria. O teor de LipC12 no extrato bruto, calculado pela diluição de 10 vezes (Figura 7), foi de 29,4%, equivalente a 4,26 mg mL⁻¹.

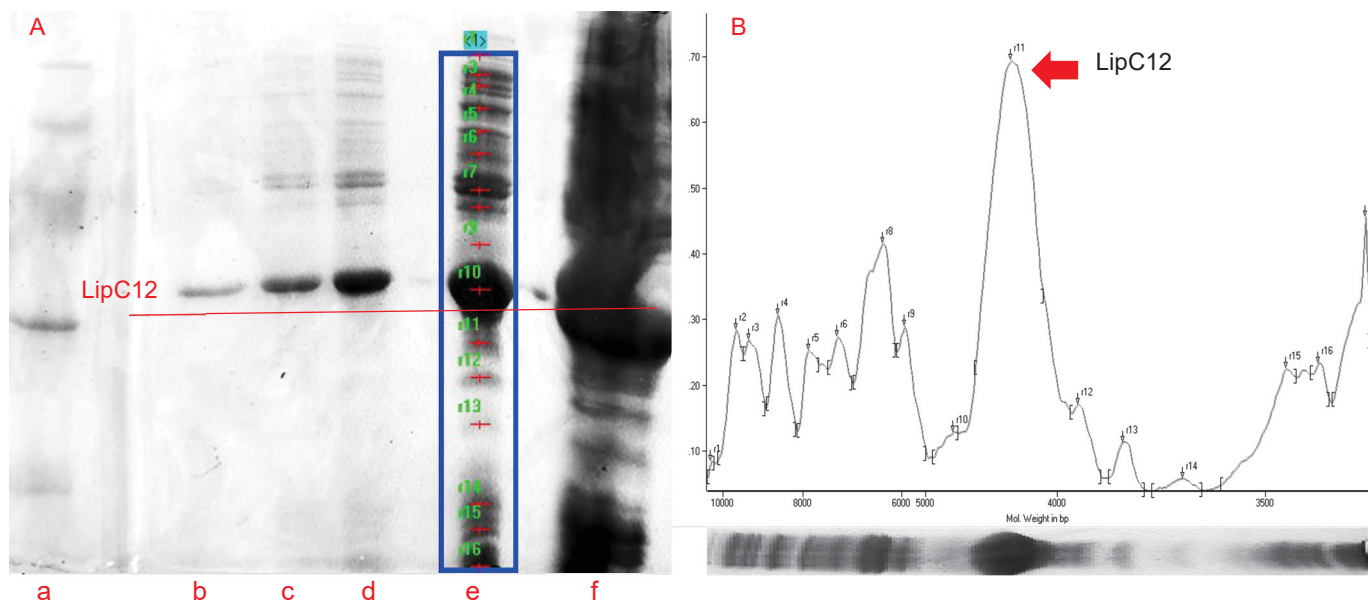


Figura 7: (A) Densitometria por imagem do SDS-PAGE contendo as diluições do extrato bruto. (B) Densidade óptica de cada banda detectada.

Legenda: a: Marcador molecular; Diluições do extrato bruto de LipC12: b: 200x; c: 100x d: 50x; e: 10x; f: 1x.

5.2 ESTUDOS PRELIMINARES – ATIVAÇÃO DE LipC12 LIVRE

LipC12 livre foi incubada com os agentes de *bioimprinting* e, após incubação, o efeito dos tratamentos foi determinado pela atividade de hidrólise da trioleína em pHStat (Figura 8). O maior aumento de atividade observado, em relação à LipC12 sem adição de agentes, foi utilizando CTAB-*t*-butanol (Figura 8, E) (48%), seguido das misturas CTAB-AO1 (Figura 8, F) e CTAB-AO5 (Figura 8, G) (31% nos dois casos). Também foi possível observar que houve diminuição na atividade utilizando apenas CTAB (Figura 8, D) e AO1 (Figura 8, B) (de 68% e 15%, respectivamente). Em relação à atividade de LipC12 sem tratamento (condição controle), os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa com nível de confiança de 95%.

O fato de as misturas contendo *t*-butanol proporcionarem aumento da atividade de LipC12 pode ser explicado pela interação da porção apolar deste

álcool com a *lid* da LipC12 (região predominantemente hidrofóbica), movimentando-a e proporcionando acesso com maior eficiência dos substratos ao túnel catalítico (YAN et al., 2009; LI et al., 2018). Este resultado é interessante considerando que *t*-butanol é um bom solubilizador de ácidos graxos, como o ácido oleico, utilizado como agente de *bioimprinting*.

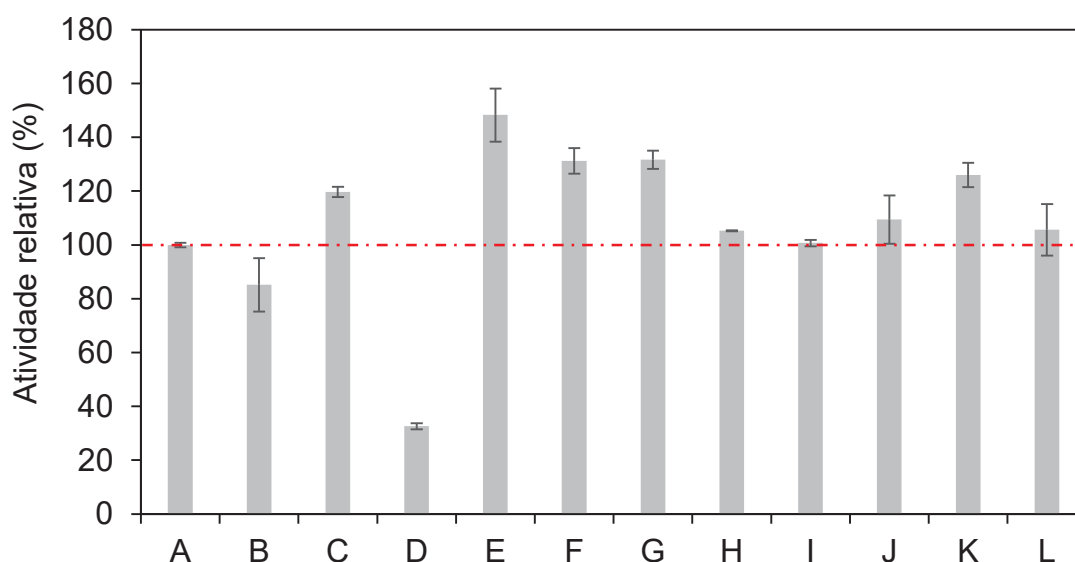


Figura 8: Efeito do tratamento com agentes de *bioimprinting* na atividade hidrolítica contra trioleína de LipC12 livre.

Legenda: A: Controle (LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação); B: AO1 (Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada); C: AO5(Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada); D: CTAB; E: CTAB-*t*-butanol; F: CTAB-AO1 (Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada); G: CTAB-AO5(Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada); H: Metanol; I: Etanol; J: *t*-butanol; K: *n*-heptano; L: Tolueno.

Condições de incubação: 4 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Todas as condições realizadas em duplicata.

Hidrólise em meio aquoso: método titulométrico com trioleína, a 37 °C pH 7,0.

5.3 ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LipC12 SEM TRATAMENTO DE *BIOIMPRINTING*

5.3.1 Imobilização por adsorção em Accurel MP-1000

Foram estudadas cargas de proteína variando entre 10 e 200 mg g⁻¹ de suporte. A imobilização foi seguida pelo teor de proteínas no sobrenadante

(Tabela 5). A maior EI (62,5%) e a maior retenção de atividade (R, 125%) foram obtidas com a menor carga de proteína (10 mg g⁻¹), confirmando resultados anteriores obtidos com o suporte Accurel MP-1000 (MADALOZZO et al., 2015).

Tabela 5: Efeito da carga de proteína na imobilização de LipC12 em Accurel MP-1000

mg:g ⁻¹ LipC12:suporte	Proteína (mg mL ⁻¹) ^a		Eficiência de imobilização (%)	R (%) ^b	Atividade de hidrólise em meio orgânico (U g ⁻¹)
	Inicial	Final			
10	0,20	0,12	62,5	125	365
50	1,00	0,9	15,0	48	203
100	2,00	1,6	17,9	20	192
200	4,00	2,7	33,0	5	201

Imobilização: 0,2 g de Accurel MP-1000, 5 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubação por 12 h a 4 °C, 150 rpm em agitador orbital.

a: Concentração de proteína no sobrenadante da imobilização; Quantificação do teor de proteína: Método BCA (4.3.4); b: Segundo 4.3.5.

A maior atividade de hidrólise contra trioleína (365 U g⁻¹, Tabela 5) em meio orgânico foi obtida com a menor carga de proteína utilizada (10 mg g⁻¹). Este valor é condizente com valores obtidos por Madalozzo et al. (2015), que relataram valor de 360 U g⁻¹, para ensaios realizados na mesma condição para LipC12 purificada. O aumento da carga de proteína, gerou queda de atividade, que se manteve constante na faixa de 200 U g⁻¹ a partir de 50 mg g⁻¹. Este comportamento pode ser explicado pela saturação do suporte, com a formação de multicamadas de proteínas, impedindo o acesso do substrato às camadas de LipC12 mais internas (MADALOZZO et al., 2015).

5.3.2 Imobilização por ligação covalente em Immobead 150-P

A imobilização de LipC12 em Immobead 150-P foi feita com diferentes cargas de proteína (Tabela 6). Verificou-se que a EI foi de 100% para todas as cargas de proteína estudadas. A atividade de hidrólise contra a trioleína em meio orgânico com a menor carga (10 mg g⁻¹) foi de 31 ± 2 U g⁻¹, sendo que aumentando-se a carga de proteína, não houve aumento da atividade. Os valores encontrados são menores do que os encontrados por Madalozzo et al. (2015) (161 U g⁻¹) para condições de imobilização e dosagem similares às deste

trabalho. Foram utilizados diferentes lotes do Immobead 150-P para comparação, pois o problema poderia estar no lote do material, mas todos os resultados foram similares, em torno de 30 U g⁻¹.

Tabela 6: Efeito da carga de proteína na imobilização de LipC12 em Immobead 150-P

mg:g ⁻¹ L:suporte	Proteína (mg mL ⁻¹) ^a		Eficiência de imobilização (%)	R (%) ^b	Atividade de hidrólise em meio orgânico (U g ⁻¹)
	Inicial	Final			
10	0,20	0,0	100	6,8	31,0
50	1,00	0,0	100	0,8	15,4
200	4,00	0,0	100	0,0	18,2
400	8,00	0,0	100	0,0	18,7

Imobilização: 0,1 g de Immobead 150-P, 5 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubação por 12 h a 4 °C, 150 rpm em agitador orbital.

a: Concentração de proteína no sobrenadante da imobilização; Quantificação do teor de proteína: Método BCA (4.3.4); b: Segundo 4.3.5.

Apesar dos resultados de relativamente baixa atividade, a continuidade dos estudos com este suporte foi mantida, já que a imobilização por interação covalente propicia maior rigidez à lipase, sendo favorável ao pré-tratamento da lipase por *bioimprinting*. Além disso, a comparação dos efeitos do *bioimprinting* entre os processos de imobilização de LipC12 (por ligação covalente e por adsorção) poderia gerar resultados interessantes.

5.4 ESTRATÉGIAS DE *BIOIMPRINTING*

5.4.1 *Bioimprinting* combinado à imobilização por adsorção

LipC12 purificada foi imobilizada em Accurel MP-1000, tendo sido aplicados o pré e o pós-tratamento por *bioimprinting*. O efeito do *bioimprinting* foi avaliado, no pré-tratamento, pela eficiência de imobilização (EI) e retenção da atividade (R), segundo 4.3.5. No pós-tratamento, LipC12 foi previamente imobilizada (4.2.4.1) e o efeito do *bioimprinting* foi avaliado (4.3.6).

5.4.1.1 Pré-tratamento de LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000

No pré-tratamento, a eficiência de imobilização (Tabela 7), variou de acordo com o agente de *bioimprinting*. Verificou-se que houve variação da eficiência de imobilização (EI) relativa ao controle (EI= 55%) com todos os agentes estudados, com destaque à diminuição utilizando aos agentes *n*-heptano ($\log P = 4,66$, EI= 5%) e tolueno ($\log P = 2,5$, EI= 21%).

A diminuição na EI com estes dois compostos pode ter ocorrido por interações hidrofóbicas entre eles e o suporte, impedindo a interação do suporte com a enzima. Em relação às EI obtidas com solventes polares metanol ($\log P = -0,66$, EI= 61%), etanol ($\log P = -0,16$, EI= 52%), e *t*-butanol ($\log P = 0,37$, EI= 55%), os resultados mostram que, devido às interações enzima-solvente, houve menor interferência destes solventes hidrofílicos na imobilização de LipC12.

A atividade de hidrólise dos derivados imobilizados foi determinada em meio orgânico, a partir da qual foi calculada a retenção de atividade (R) (Tabela 7). Todos os tratamentos causaram diminuição da atividade e, conseqüentemente, valores de R menores do que 100%, com exceção ao pré-tratamento com *n*-heptano, que, apesar de ter apresentado a mais baixa eficiência de imobilização (5%), produziu a retenção de atividade mais alta (242%). Este valor de R indica que LipC12 foi ativada por incubação em *n*-heptano, como observado para o tratamento de LipC12 livre com o mesmo solvente (Figura 8).

Os resultados de pré-tratamento (Tabela 7) mostram que agentes de *bioimprinting* que ativaram LipC12 livre, ácido oleico, CTAB e suas misturas (item 5.2), não proporcionaram aumento de atividade de LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000. Isto provavelmente ocorreu devido à redução nos valores de EI, indicando interferência dos agentes no processo de imobilização, o que é particularmente pronunciado nos solventes com $\log P$ elevados como o *n*-heptano ($\log P = 4,66$) e tolueno ($\log P = 2,5$).

Tabela 7: Parâmetros de imobilização em Accurel MP-1000 e atividade de hidrólise contra trioleína de LipC12 em meio orgânico após o pré-tratamento com agentes de *bioimprinting*.

Condição	EI (%) ^a	R (%) ^b	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹)	Atividade em relação ao controle (%)
Controle ^c	55	137	346 ± 34	100 ± 10
AO1	62	33	95 ± 2	27 ± 2
AO5	64	35	102 ± 14	29 ± 14
CTAB	59	41	107 ± 10	31 ± 9
CTAB- <i>t</i> -butanol	51	46	110 ± 7	32 ± 6
CTAB-AO1	68	41	42 ± 3	12 ± 6
CTAB-AO5	62	39	130 ± 4	37 ± 3
Metanol	63	62	111 ± 4	32 ± 3
Etanol	64	65	178 ± 11	51 ± 6
<i>t</i> -butanol	29	77	191 ± 1	55 ± 1
<i>n</i> -heptano	5	242	59 ± 3	17 ± 5
Tolueno	21	59	56 ± 3	16 ± 5

Legenda: **a**, **b**: Eficiência de imobilização (EI) e retenção da atividade (R) segundo 4.3.5; **c**: LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000 sem incubação; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada.

Condições de incubação: 4 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min.

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley; Quantificação do teor de proteína: Método BCA (4.3.4).

5.4.1.2 Pós-tratamento de LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000

Nos experimentos de pós-tratamento, foi utilizada LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000, incubada por 15 min com os agentes de *bioimprinting*. A atividade de hidrólise (Tabela 8) dos derivados imobilizados foi determinada em meio orgânico (4.3.6). Houve diminuição de cerca de 80% na atividade para a maioria dos derivados imobilizados em relação ao controle, indicando que o *bioimprinting* por pós-tratamento também não foi efetivo para ativar LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000. As menores diminuições de atividade foram observadas para CTAB (40%) e CTAB-AO1 (35%). A diminuição da atividade pode ser explicada pela lixiviação da enzima do suporte durante o processo de *bioimprinting*, uma vez que o pós-tratamento é realizado em soluções aquosas.

Tabela 8: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000 após o tratamento com agentes de *bioimprinting*.

Condição	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹)	Atividade em relação ao controle (%)
Controle ^a	346 ± 34	100 ± 10
Controle incubado em tampão ^b	344 ± 28	99 ± 8
AO1	39 ± 1	11 ± 3
AO5	53 ± 4	15 ± 8
CTAB	205 ± 20	59 ± 10
CTAB- <i>t</i> -butanol	43 ± 1	12 ± 3
CTAB-AO1	190 ± 6	55 ± 3
CTAB-AO5	57 ± 3	16 ± 5
Metanol	40 ± 2	12 ± 4
Etanol	42 ± 1	12 ± 2
<i>t</i> -butanol	59 ± 5	17 ± 9
<i>n</i> -heptano	11 ± 1	3 ± 1
Tolueno	31 ± 1	9 ± 4

Legenda: **a**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação; **b**: LipC12 imobilizada em Accurel MP-1000 incubada em meio de incubação para *bioimprinting*, porém sem adição de agente de *bioimprinting*; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada;

Bioimprinting: pós-tratamento - 4 mL de solução tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Lavagem: (2x) 5 mL de *t*-butanol, filtrados em papel filtro Whatman n °15 secagem em dessecador, 24 h

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

A partir dos resultados da Tabela 8, conclui-se que os agentes de *bioimprinting* utilizados, tanto para o pré-tratamento, como para o pós-tratamento, reduziram a atividade dos derivados imobilizados e, portanto, estes tratamentos não foram eficientes para a ativação de LipC12 quando imobilizada por adsorção hidrofóbica em Accurel MP-1000.

5.4.2 *Bioimprinting* combinado à imobilização por ligação covalente

Foram aplicadas duas abordagens para a técnica de *bioimprinting*: o pré-tratamento de LipC12 livre e o pós-tratamento de LipC12 imobilizada. Foram utilizadas as frações purificadas e o extrato bruto de LipC12.

5.4.2.1 *Bioimprinting utilizando a fração purificada de LipC12*

5.4.2.1.1 Pré-tratamento de LipC12 purificada imobilizada em Immobead 150-P

A retenção de atividade após o processo de imobilização, R, e os valores de atividade de hidrólise em meio orgânico observados após o pré-tratamento são mostrados na Tabela 9. Os valores de EI foram de 100% para todas as condições do pré-tratamento da fração purificada, e os agentes de *bioimprinting* mais efetivos foram AO5 com ativação de 828%, seguidos por metanol, etanol e *n*-heptano, com ativação de 785%, 767% e 674%, respectivamente. Embora os valores de R tenham sido menores do que 100%, todos os tratamentos apresentaram valores superiores de retenção em relação ao controle, que apresentou um valor de R de apenas 7%. Os maiores valores de R foram obtidos com AO5 (56%), metanol (53%), etanol (52%) e *n*-heptano (46%). Estes baixos valores de R estão relacionados ao fato de a imobilização ocorrer por ligações covalentes, que promovem o enrijecimento da proteína, causando perda de atividade em relação à enzima livre. Mesmo assim, o pré-tratamento de LipC12 com agentes de *bioimprinting* proporcionou ativação de LipC12 após a imobilização em Immobead 150-P.

Tabela 9: Parâmetros de imobilização em Immobead 150-P e atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 após o pré-tratamento com agentes de *bioimprinting*.

Condição	R (%) ^a	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹)	Atividade em relação ao controle (%)
Controle ^b	7	31 ± 0	100 ± 0
AO1	35	160 ± 3	517 ± 2
AO5	56	257 ± 29	828 ± 11
CTAB	6	29 ± 1	94 ± 3
CTAB- <i>t</i> -butanol	30	136 ± 5	438 ± 3
CTAB-AO1	14	66 ± 5	211 ± 8
CTAB-AO5	14	66 ± 5	211 ± 8
Metanol	53	243 ± 17	785 ± 7
Etanol	52	238 ± 6	767 ± 2
<i>t</i> -butanol	17	77 ± 1	248 ± 1
<i>n</i> -heptano	46	209 ± 33	674 ± 15
Tolueno	33	150 ± 11	483 ± 7

Legenda: **a**: Retenção da atividade (R) segundo 4.3.5; **b**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; Eficiência de imobilização (EI): 100% para todos os tratamentos

Bioimprinting: pré-tratamento - 4 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Imobilização: 0,1 g de Immobead 150-P, 5 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 6 h. Lavagem: (2x) 5 mL de *t*-butanol, filtrados em papel filtro Whatman n °15 secagem em dessecador, 24 h.

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.4.2.1.2 Pós-tratamento de LipC12 purificada imobilizada em Immobead 150-P

LipC12 foi imobilizada em Immobead 150-P, sem o pré-tratamento, de acordo com o procedimento descrito em 4.2.4.2, e os derivados imobilizados foram tratados posteriormente à imobilização com os mesmos agentes de *bioimprinting* testados no pré-tratamento. Verificou-se (Tabela 10) que os agentes de *bioimprinting* mais efetivos foram AO5 (1211%), seguido por etanol (611%) e *n*-heptano (352%).

Tabela 10: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico dos derivados imobilizados em Immobead 150-P após o pós-tratamento com agentes de *bioimprinting*

Condição	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹)	Atividade em relação ao controle (%)
Controle ^a	31 ± 0	100 ± 0
Controle incubado em tampão ^b	33 ± 2	106 ± 6
AO1	62 ± 7	199 ± 11
AO5	375 ± 40	1211 ± 10
CTAB	51 ± 3	166 ± 6
CTAB- <i>t</i> -butanol	84 ± 6	271 ± 6
CTAB-AO1	54 ± 4	174 ± 7
CTAB-AO5	37 ± 18	119 ± 21
Metanol	92 ± 2	297 ± 2
Etanol	189 ± 16	611 ± 8
<i>t</i> -butanol	58 ± 2	187 ± 4
<i>n</i> -heptano	109 ± 13	352 ± 12
Tolueno	44 ± 1	142 ± 3

Legenda: **a**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação; **b**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P incubada em meio de incubação para *bioimprinting*, porém sem adição de agente de *bioimprinting*; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; Eficiência de imobilização (EI): 100% para todos os tratamentos

Imobilização: 0,1 g de Immobead 150-P, 5 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 6 h.

Bioimprinting: pós-tratamento: 4 mL de solução tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Lavagem: (2x) 5 mL de *t*-butanol, filtrados em papel filtro Whatman n °15 secagem em dessecador, 24 h.

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Para verificação do efeito do meio aquoso no pós-tratamento dos derivados imobilizados, LipC12 imobilizada foi submetida ao pós-tratamento com os mesmos agentes da Tabela 10, solubilizados ou misturados em *n*-hexano como meio de *bioimprinting*.

Tabela 11: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 purificada imobilizada em Immobead 150-P com pós-tratamento por *bioimprinting* em meio orgânico.

Condição	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹)	Ativação em relação ao controle (%)
Controle ^a	31 ± 1	100 ± 1
Controle incubado <i>n</i> -hexano ^b	49 ± 3	158 ± 7
AO1	38 ± 9	122 ± 22
AO5	56 ± 2	180 ± 3
CTAB	8 ± 2	27 ± 20
CTAB- <i>t</i> -butanol	4 ± 1	14 ± 11
CTAB-AO1	6 ± 1	19 ± 9
CTAB-AO5	5 ± 1	17 ± 9
Metanol	32 ± 3	103 ± 8
Etanol	37 ± 8	120 ± 20
<i>t</i> -butanol	54 ± 1	175 ± 1
<i>n</i> -heptano	42 ± 3	135 ± 6
Tolueno	38 ± 5	124 ± 14

Legenda: **a**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação; **b**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P incubada em meio de incubação para *bioimprinting*, porém sem adição de agente de *bioimprinting*; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada; Eficiência de imobilização (EI): 100% para todos os tratamentos

Imobilização: 0,1 g de Immobead 150-P, 5 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 6 h.

Bioimprinting: pós-tratamento: 4 mL de *n*-hexano e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Lavagem: (2x) 5 mL de *t*-butanol, filtrados em papel filtro Whatman n °15 secagem em dessecador, 24 h.

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Verificou-se (Tabela 11) que a ativação em relação ao controle foi bem menor do que os valores obtidos em meio aquoso, e, similarmente aos resultados em meio aquoso, observou-se que os agentes de *bioimprinting* mais efetivos foram AO5, com ativação de 180%, seguido por *t*-butanol e *n*-heptano com ativação de 175% e 135%, respectivamente. Os solventes hidrofílicos (etanol e metanol), por outro lado, não tiveram o mesmo efeito de ativação, provavelmente devido à sua insolubilidade no meio reacional contendo *n*-hexano, que limitou o contato destes solventes com LipC12 imobilizada, possivelmente devido à formação de um sistema bifásico entre o solvente hidrofílico e o *n*-hexano.

5.4.2.2 Bioimprinting utilizando o extrato bruto de LipC12

Com a obtenção de derivados imobilizados a partir do extrato purificado, indicando aumento da atividade, optou-se por realizar os testes de *bioimprinting* com imobilização a partir do extrato bruto (EB) de LipC12. Esta abordagem de imobilização seletiva de LipC12 dispensaria as etapas de purificação da enzima, diminuindo o tempo e o custo para obtenção dos derivados imobilizados (MADALOZZO et al., 2015). Destaca-se que o extrato bruto livre de células de *E. coli* BL21(DE3) sem o plasmídeo com a sequência da lipase LipC12 não apresentou atividade hidrolítica contra trioleína.

5.4.2.2.1 Pré-tratamento do extrato bruto de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P

O pré-tratamento do extrato bruto indicou que os agentes de *bioimprinting* mais efetivos (Tabela 12) foram AO5, com ativação de 935%, seguido por *n*-heptano e tolueno, com ativação de 836% e 827%, respectivamente. Todos os solventes hidrofílicos (etanol, metanol e *t*-butanol) foram efetivos como agentes de pré-tratamento, com ativações variando de 719% a 748%.

Observou-se que o melhor agente de *bioimprinting* obtido até esta etapa foi o AO5 (Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 20 mg de extrato bruto). Comparando-se os resultados obtidos nos pré-tratamentos da fração de LipC12 purificada com os do extrato bruto, observou-se uma maior atividade de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P quando imobilizada no extrato bruto (290 U g⁻¹) quando comparada à LipC12 imobilizada da fração purificada (257 U g⁻¹), mostrando que se pode imobilizar LipC12 diretamente do extrato bruto e obter um derivado imobilizado com alta atividade.

Tabela 12: Parâmetros de imobilização em Immobead 150-P e atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico de LipC12 após o pré-tratamento com agentes de *bioimprinting*.

Condição	R (%) ^a	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹)	Atividade em relação ao controle (%)
Controle ^b	7	31 ± 0	100 ± 0
AO1	18	66 ± 12	211 ± 18
AO5	80	290 ± 35	935 ± 12
CTAB	18	65 ± 12	209 ± 18
CTAB- <i>t</i> -butanol	22	80 ± 13	257 ± 15
CTAB-AO1	47	170 ± 12	548 ± 7
CTAB-AO5	24	86 ± 2	276 ± 2
Metanol	63	227 ± 8	731 ± 3
Etanol	64	232 ± 24	748 ± 10
<i>t</i> -butanol	62	223 ± 35	719 ± 15
<i>n</i> -heptano	72	259 ± 10	836 ± 3
Tolueno	71	257 ± 18	827 ± 7

Legenda: **a**: Retenção (R) de atividade calculada segundo 4.3.6; Eficiência de imobilização (EI): 100% para todos os tratamentos; **b**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 20 mg de proteína; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 20 mg de proteína.

Bioimprinting: pré-tratamento: 4 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Imobilização: 0,1 g de Immobead 150-P, 5 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 6 h. Lavagem: (2x) 5 mL de *t*-butanol, filtrados em papel filtro Whatman n °15 secagem em dessecador, 24 h.

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.4.2.2.2 Pós-tratamento do extrato bruto de de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P

No pós-tratamento, os agentes de *bioimprinting* mais efetivos (Tabela 13) foram AO1 com ativação de 1355%, seguido por *t*-butanol e metanol, com ativação de 1216% e 1024%, respectivamente. Ressalta-se que a maior ativação foi obtida com AO1 (Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 20 mg de extrato bruto), ao contrário de experimentos anteriores, nos quais AO5 se mostrou mais efetivo. É provável que uma maior concentração de proteína no extrato bruto de LipC12, no pré-tratamento, tenha requerido mais moléculas de ácido oleico no meio para haver moléculas suficientes para interagir com LipC12 e proporcionar um efeito positivo na lipase

Tabela 13: Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico dos derivados imobilizados do EB em Immobead 150-P com pós-tratamento com agentes de *bioimprinting*.

Condição	Atividade em meio orgânico (U g ⁻¹)	Atividade em relação ao controle (%)
Controle ^a	31 ± 0	100 ± 0
Controle incubado em tampão ^b	140 ± 2	452 ± 1
AO1	420 ± 25	1355 ± 6
AO5	286 ± 58	922 ± 20
CTAB	27 ± 7	87 ± 26
CTAB- <i>t</i> -butanol	73 ± 12	235 ± 16
CTAB-AO1	84 ± 12	271 ± 14
CTAB-AO5	84 ± 2	269 ± 2
Metanol	317 ± 49	1024 ± 15
Etanol	196 ± 33	630 ± 17
<i>t</i> -butanol	377 ± 36	1216 ± 9
<i>n</i> -heptano	213 ± 6	688 ± 2
Tolueno	247 ± 21	797 ± 8

Legenda: **a**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação; **b**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P incubada em meio de incubação para *bioimprinting*, porém sem adição de agente de *bioimprinting*; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 20 mg de proteína; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 20 mg de proteína; Eficiência de imobilização (EI): 100% para todos os tratamentos

Imobilização: 0,1 g de Immobead 150-P, 5 mL de solução de LipC12 em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 6 h.

Bioimprinting: pós-tratamento: 4 mL de solução tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,5 e 1 mL de agente de *bioimprinting*, incubados a 4 °C, sob agitação orbital de 150 rpm por 15 min. Lavagem: (2x) 5 mL de *t*-butanol, filtrados em papel filtro Whatman n °15 secagem em dessecador, 24 h.

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS IMOBILIZADOS COM MAIOR ATIVIDADE RELATIVA

Os derivados imobilizados que apresentaram a atividade de hidrólise mais alta para cada um dos diferentes tratamentos de *bioimprinting* (Tabela 14) foram caracterizados em relação à atividade de esterificação. Destaca-se que, a partir desta etapa, apenas as condições que apresentaram algum aumento de atividade relativa foram utilizadas, isto é, não foram utilizados derivados imobilizados em Accurel MP-1000.

Tabela 14: Resumo das melhores condições para cada variação do processo de *bioimprinting*

Variação do processo	Fonte de LipC12	Agente de <i>bioimprinting</i>	Atividade em relação ao respectivo controle (%)
Pré-tratamento	Purificada	AO5	828 ± 11
Pós-tratamento (aquoso)	Purificada	AO5	1210 ± 10
Pós-tratamento (orgânico)	Purificada	AO5	179 ± 3
Pré-tratamento	Extrato bruto	AO5	935 ± 12
Pós-tratamento	Extrato bruto	AO1	1355 ± 6

Legenda: AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada ou 20 mg de proteína; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada ou 20 mg de proteína.

Hidrólise em meio orgânico: 4,7 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% (v/v) de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.5.1 Determinação da atividade de esterificação – reação de síntese do oleato de etila

A determinação da atividade de esterificação (Figura 9) indicou que, em todos os casos, houve aumento da atividade do derivado imobilizado tratado por *bioimprinting*, em relação ao respectivo controle.

Os valores de atividade de esterificação dos controles, correspondentes a 100%, são de 46,2 U g⁻¹ para LipC12 imobilizada a partir da fração purificada e 84,2 U g⁻¹ LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto. Os aumentos mais expressivos foram obtidos com os tratamentos 4,6 e 7, correspondentes ao pós-tratamento em meio orgânico com AO5 (312%, atividade de 144,5 U g⁻¹), ao pré-tratamento de LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto com AO5 (345%, atividade de 290,3 U g⁻¹), e ao pós-tratamento de LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto com AO1 (307%, atividade de 258,8 U g⁻¹).

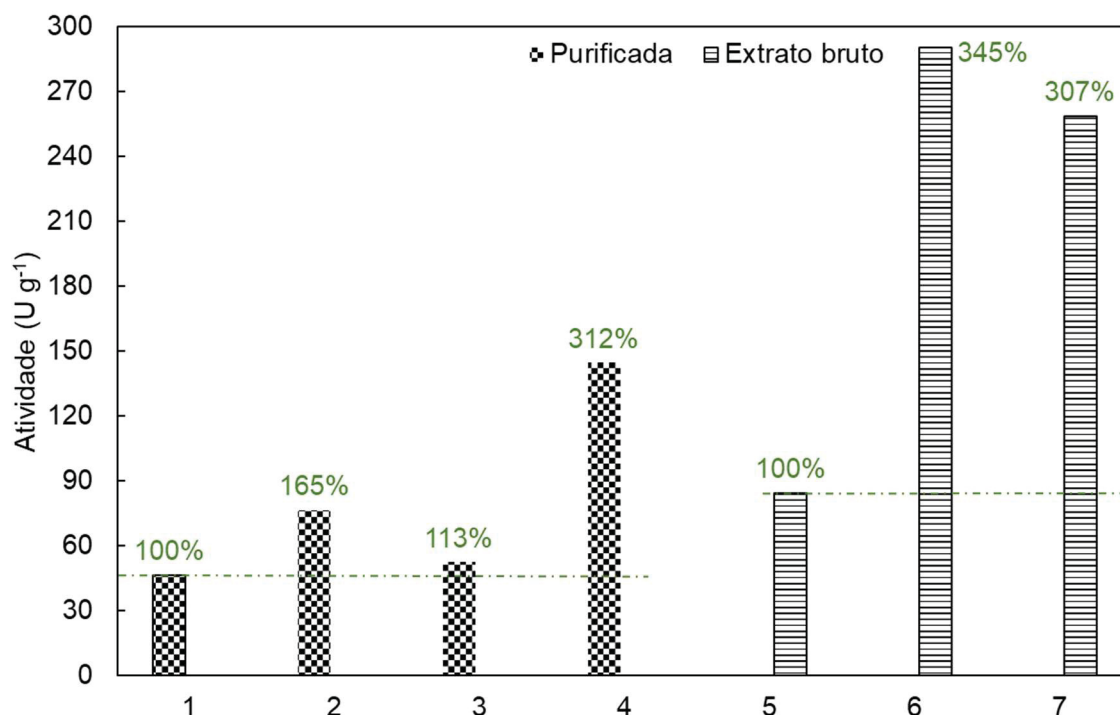


Figura 9: Atividade de esterificação de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P após os tratamentos de *bioimprinting*.

Legenda: **LipC12 imobilizada a partir da fração purificada** – 1 – Controle, sem tratamento (46,2 U g⁻¹); 2 - Pré-tratamento com AO5(Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada); 3 - Pós-tratamento com AO5(Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada); 4 - Pós-tratamento em meio orgânico com AO5; **LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto** – 5 - Controle, sem tratamento (84,2 U.g⁻¹); 6 - Pré-tratamento com AO5 (Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 20 mg de proteína); 7 - Pós-tratamento com AO1 (Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 20 mg de proteína).

Atividade de esterificação: 3,5 mL de solução de ácido oleico 0,1 mol L⁻¹, 1,44 mL de *n*-hexano, 61 µL de etanol absoluto, aproximadamente 150 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

5.5.2 Estabilidade de LipC12 imobilizada com tratamento de *bioimprinting* após ciclos de reuso

O derivado imobilizado selecionado para os ensaios de reutilização após ciclos de reação, foi o que apresentou melhor resultado na atividade de esterificação, ou seja, o imobilizado a partir do extrato bruto, pré-tratado com AO5 (ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 20 mg de proteína), com 345% de aumento em relação ao controle. Este mesmo derivado apresentou 935% de aumento em relação ao controle no ensaio de atividade de hidrólise em meio orgânico. Observou-se (Figura 10) que LipC12 imobilizada manteve sua atividade após 10 ciclos reacionais.

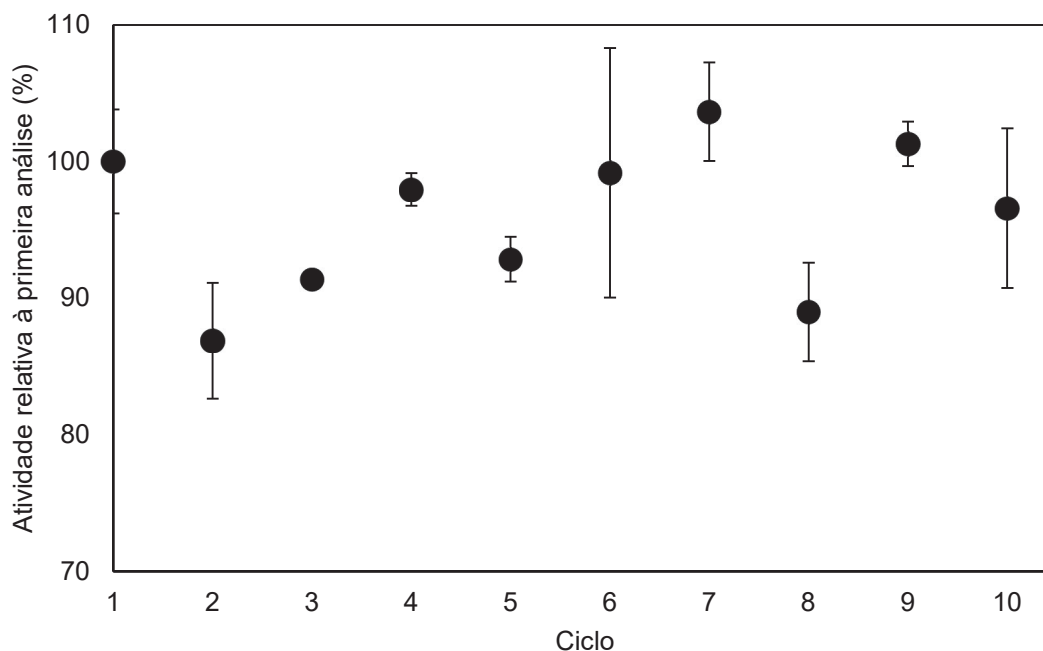


Figura 10: Estabilidade ao reuso de LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto com pré-tratamento de *bioimprinting* em reações de hidrólise em meio orgânico.

Hidrólise em meio orgânico: 5 mL de *n*-hexano, 70 mmol L⁻¹ trioleína, 2% de água, 20 mg de derivado imobilizado, 180 rpm, 40 °C. Teor de ácidos graxos residuais analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Reuso: Filtragem do derivado imobilizado, lavagem com 5 mL de *n*-hexano (3x), secagem a vácuo em dessecador sob vácuo por 24 h a 4 °C.

Mesmo a escolha tendo sido baseada em ensaios de atividade de esterificação, optou-se realizar a verificação da atividade após reuso por meio de ensaios de atividade de hidrólise em meio orgânico, pelo fato de que nesta análise, são adicionados 2% (v/v) de água ao meio reacional. O *bioimprinting* tende a perder seu efeito quando a quantidade de água em contato com a lipase aumenta, ao introduzir flexibilidade a molécula da lipase, permitindo que ela volte à estrutura antes do *bioimprinting* (FORESTI et al., 2005). Assim sendo os resultados obtidos são indicativos ainda mais robustos da estabilidade e eficiência da metodologia empregada, já que os efeitos do *bioimprinting* em LipC12 se mantiveram após os ciclos de reuso.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a utilização da técnica de *bioimprinting* por pré-tratamento ou pós-tratamento não foi efetiva quando foi utilizado um suporte hidrofóbico e a imobilização por adsorção. O pré-tratamento de LipC12 livre (Figura 8) com os agentes de *bioimprinting* hidrofóbicos possivelmente causaram interferência no processo de imobilização, resultando em baixas eficiências de imobilização. Por outro lado, o pós-tratamento dos derivados imobilizados com os agentes de *bioimprinting* em meio aquoso provavelmente causaram dessorção da enzima do suporte, levando a baixas atividades residuais. Trabalhos futuros podem explorar o pós-tratamento em meio orgânico para evitar este problema, já que outros autores verificaram aumento de atividade de esterificação para outras lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos, como descrito a seguir.

Su et al. (2014) imobilizaram a lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) em resina hidrofóbica macroporosa NKA, e verificaram aumento de 209% (113 U g⁻¹ do controle para 350 U g⁻¹ com *bioimprinting* por ácido láurico, simultâneo à imobilização) na atividade de esterificação de ROL, usando o destilado desodorizado do óleo de colza e etanol. Além disso, os autores não verificaram interferência dos agentes de *bioimprinting* na eficiência de imobilização, em relação ao controle, que foi de 95% para carga de 40 mg de ROL para 300 mg de resina NKA.

Utilizando o mesmo suporte (resina NKA), Liu et al. (2011) imobilizaram a lipase de *Burkholderia cepacia* com pré-tratamento com ácido láurico em *i*-propanol, com eficiência de imobilização de 85,67% obtendo aumento na atividade específica de 21,7 vezes, frente à esterificação do ácido oleico e etanol, em relação à lipase livre sem qualquer tratamento. Os autores atribuem o aumento da atividade à formação de um complexo enzima-suporte com uma conformação aberta adequada, porém, em comparação com o controle, os parâmetros de imobilização, que incluem a eficiência de imobilização, atividade específica e recuperação da atividade da lipase, não mostraram aumentos significativos.

Yan et al. (2009) conduziram o pré-tratamento da lipase de *Geotrichum sp.* utilizando estratégia combinada de *bioimprinting* por ácido oleico, metanol e

t-butanol, ajuste de pH, utilização de KCl como lioprotetor e revestimento por lecitina, para em seguida imobilizar em resina NKA e liofilizar. Verificou-se aumento na atividade de esterificação de 18,4 vezes em relação ao controle (enzima imobilizada sem qualquer tratamento), utilizando ácido oleico com metanol. Os autores concluíram que a estabilidade operacional da lipase pode ser aumentada através de estratégias combinadas (*bioimprinting*, ajuste de pH, lioprotetores e revestimento com lecitina), porém, com diminuição na eficiência de imobilização, já que o suporte pode adsorver também essas moléculas.

Liu et al. (2013) imobilizaram a lipase de *Yarrowia lipolytica* (YLL) em resina hidrofóbica D4020 após pré-tratamento de YLL com (*R*)-2-octanol e Triton X-100 dissolvidos em isopropanol, obtendo-se um aumento da atividade de esterificação, usando álcool vinílico com acetaldeído, de 40 para 354 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, 8,85 vezes em relação ao controle sem tratamento.

Foresti et al. (2005) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em pó de polipropileno e a submeteram ao *bioimprinting* com mistura comercial de ácidos graxos (C₁₄: 1,6%, C₁₄: 11,9%, C₁₆: 5,7%, C₁₆: 111,7%, C₁₈: 179,1% - g%) dissolvidos em etanol, obtendo aumento de 68% na atividade de esterificação quando comparada à lipase imobilizada não tratada. Concluiu-se que a solubilidade, comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, assim como a posição da dupla ligação do ácido graxo usado como composto molde influenciaram no processo de *bioimprinting*. Também se verificou que o teor de água (20% de tampão pH 7) do meio reacional não reverteu o *bioimprinting* obtido, embora o aumento da atividade devido ao *bioimprinting* tenha sido 2,6 vezes maior na ausência de água.

Por outro lado, os resultados obtidos com a imobilização de LipC12 por ligação covalente em Immobead 150-P em conjunto com a técnica de *bioimprinting*, tanto como pré-tratamento quanto pós-tratamento, se mostraram efetivos (Tabela 14). Constatou-se que, dentre os agentes testados, o ácido oleico solubilizado em *t*-butanol foi o agente de *bioimprinting* que proporcionou maior ativação de LipC12 imobilizada em todas as formas de *bioimprinting* testadas, seja como pré ou pós-tratamento, com LipC12 imobilizada a partir da fração purificada ou a partir do extrato bruto. Comparativamente, neste último tipo de tratamento, os melhores resultados de ativação de LipC12 foram obtidos com o pós-tratamento de LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto com AO1,

(solução de ácido oleico dissolvido em *t*-butanol, 29,4 nmol por 20 mg de proteína), no qual a ativação da enzima foi de 1355% em relação ao controle. Altos valores de ativação (1210%) também foram obtidos quando LipC12 foi imobilizada a partir da fração purificada.

Ressalta-se ainda a ativação de LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto com pós-tratamento com um solvente tipicamente desnaturante e inibidor de lipases, como o metanol, para o qual foi obtida uma ativação de 1024%. Estes tipos de tratamento podem propiciar a utilização de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P em processos que utilizam solventes polares, particularmente o metanol e o etanol, em meios reacionais com altas concentrações de solventes (meios livres de solventes) para síntese de produtos de interesse industrial, como biodiesel, biolubrificantes e bioplásticos, abrindo possibilidades de estudos em trabalhos futuros.

Tabela 15: Compilado de resultados obtidos neste trabalho para os tratamentos de *bioimprinting* LipC12 imobilizada em Immobead 150-P.

<u>Condição</u>	<u>Atividade de hidrólise contra trioleína em meio orgânico em relação ao controle (%)</u>					
	<u>Purificada</u>			<u>Extrato bruto</u>		
	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pós-tratamento (orgânico)	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pós-tratamento
Controle sem incubação ^a	100	100	100	100	100	100
Controle com incubação ^b	N.A	106 ± 6	158 ± 7	N.A	452 ± 1	
AO1	517 ± 2	199 ± 11	122 ± 22	211 ± 18	1355 ± 6	
AO5	828 ± 11	1210 ± 10	179 ± 3	935 ± 12	922 ± 20	
CTAB	94 ± 3	166 ± 6	27 ± 20	209 ± 18	87 ± 26	
CTAB- <i>t</i> -butanol	438 ± 3	271 ± 6	14 ± 11	257 ± 15	235 ± 16	
CTAB-AO1	211 ± 8	174 ± 7	19 ± 9	548 ± 7	271 ± 14	
CTAB-AO5	211 ± 8	119 ± 21	17 ± 9	276 ± 2	269 ± 2	
Metanol	785 ± 7	297 ± 2	103 ± 8	731 ± 3	1024 ± 15	
Etanol	766 ± 2	611 ± 8	120 ± 20	748 ± 10	630 ± 17	
<i>t</i> -butanol	248 ± 1	187 ± 4	175 ± 1	719 ± 15	1216 ± 9	
<i>n</i> -heptano	673 ± 15	352 ± 12	135 ± 6	836 ± 3	688 ± 2	
Tolueno	483 ± 7	142 ± 3	124 ± 14	827 ± 7	797 ± 8	

Legenda: **a**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P sem incubação; **b**: LipC12 imobilizada em Immobead 150-P incubada em meio de incubação para *bioimprinting*, porém sem adição de agente de *bioimprinting*; AO1: Ácido oleico 29,4 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada ou 20 mg de proteína; AO5: Ácido oleico 147 nmol em *t*-butanol por 1 mg de LipC12 purificada ou 20 mg de proteína; N.A: Não aplicável.

O aumento da atividade catalítica de LipC12, no pré ou pós-tratamento provavelmente ocorreu devido ao fato de a lipase ou o derivado imobilizado ter sido tratado com um produto da reação de hidrólise, aumentando a seletividade da enzima para a reação utilizando substratos estruturalmente similares, sugerindo que a mudança conformacional preferencial sofrida pela lipase na região do túnel catalítico é induzida pelo ácido oleico, similar ao descrito por Diaz-Vidal et al. (2019) e Koter e Ceynowa (2003). Além disso, a combinação do álcool *t*-butílico e o ácido oleico pode ter favorecido a ocorrência das interações com a região hidrofóbica do domínio *lid*, favorecendo a abertura da *lid*, provocando, conseqüentemente, a ativação da lipase.

Uma observação pertinente aplicável às alterações sofridas pela lipase LipC12 é relativa aos resultados do pós-tratamento, que produziu maior ativação da lipase. Isto pode ter ocorrido porque, em meio aquoso, durante a imobilização, que devido, a lipase majoritariamente encontrava-se na conformação fechada e, nesta conformação, foi imobilizada. O processo de *bioimprinting*, seguido pela lavagem do derivado imobilizado tratado com *t*-butanol, provavelmente promoveu a abertura da *lid*, ativando a lipase imobilizada.

Sánchez et al. (2021) utilizaram extrato bruto de LipC12 imobilizada em Immobead 150-P na hidrólise do óleo de soja em *n*-heptano (água:óleo, 10:1). Não foi observado aumento efetivo na atividade em relação ao controle (apenas LipC12 imobilizada) após o *bioimprinting* simultâneo à imobilização por ácido oleico do extrato bruto de LipC12 (na razão de 30 µmol de ácido oleico para 100 mg de extrato bruto liofilizado). Por outro lado, a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas de celulose modificadas por dendrímeros de melamina-glutaraldeído, e *bioimprinting* como pós-tratamento por acetato de vinila puro e em mistura com outros agentes conduzida por Li et al. (2018) indicou que o *bioimprinting* usando acetato de vinila diminuiu o tempo da reação de transesterificação entre (*R,S*)-1-feniletanol e acetato de vinila em *n*-heptano em relação ao controle de 3 h para 20 min.

Em relação aos resultados da atividade de esterificação de LipC12 imobilizada em conjunto com *bioimprinting* (Figura 9), o melhor resultado para o derivado obtido a partir da fração purificada foi o pós-tratamento com AO5 realizado em *n*-hexano, com aumento de 312% (3,1 vezes) na atividade de esterificação em relação ao controle. Para o derivado obtido a partir do extrato

bruto, o pré-tratamento com AO5 mostrou um aumento de 344% (3,4 vezes) em relação ao controle

Tais valores de ativação são excelentes quando comparados a outros estudos que também utilizaram ácido oleico como agente de *bioimprinting*. Sánchez et al. (2021), verificaram o aumento de 17% na conversão do ácido oleico em éster (para a síntese do oleato de pentila) utilizando LipC12 imobilizada em Immobead 150-P a partir do extrato bruto, com *bioimprinting* realizado simultaneamente à imobilização utilizando 30 μmol de ácido oleico por 100 mg de extrato bruto

Li et al. (2018) imobilizaram covalentemente a lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas modificadas por dendrímeros de melamina-glutaraldeído, com *bioimprinting* por acetato de vinila puro e em mistura com outros agentes como pós-tratamento. Verificou-se aumento de 10% na atividade da enzima imobilizada, utilizando a transesterificação entre (*R,S*)-1-feniletanol o acetato de vinila em *n*-heptano .em relação ao controle.

A lipase de *Pseudomonas sp.* foi imobilizada por ligação covalente em membrana bifuncional de poliamida por Koter e Ceynowa (2003), com pré-tratamento por *bioimprinting* utilizando como agente o (*1R,2S*)-(*S*)-trans-2-fenil-1-ciclohexanol, um produto da reação de transesterificação do acetato de vinila com (*R,S*)-trans-2-fenil-ciclohexanol. Os autores avaliaram o excesso enantiomérico (ee_p) dos produtos, e constataram que a lipase imobilizada com *bioimprinting* resultou em ee_p acima de 98%, enquanto na condição controle alcançava-se somente 80%.

Outros autores avaliaram por atividade de esterificação outras lipases em variações do tratamento de *bioimprinting* com diferentes técnicas e suportes. Diaz-Vidal et al. (2019) observaram aumento de 160% na atividade catalítica de CLEAs de CALB na reação de síntese do Olvanil (*N*-vaniloleamida), utilizando o próprio produto como agente de *bioimprinting*. Hilal et al. (2004) obtiveram derivado imobilizado a partir da adsorção de CLEAs da lipase de *Candida rugosa* (CRL) a uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE), que foi aplicada na esterificação do ácido oleico com *n*-butanol, resultando em aumento de até 4% de atividade. CRL imobilizada em polipropileno em pó apresentou aumento de 68% na atividade de esterificação utilizando a síntese do oleato de etila (Foresti et al., 2005). Yan et al. (2009) observaram aumento de 1840% (18,4 vezes) na

atividade da enzima para a reação de esterificação do ácido oleico com metanol pela lipase de *Geotrichum sp.* adsorvida em resina macroporosa NKA.

Os resultados deste trabalho mostram que o aumento percentual da atividade de esterificação de derivados imobilizados de LipC12 em relação ao respectivo controle foi maior que o observado na maioria dos outros trabalhos publicados. No processo de *bioimprinting*, a substituição da secagem por liofilização por filtragem e lavagem do derivado imobilizado com solvente orgânico na etapa de remoção dos agentes de *bioimprinting* pode ter evitado desnaturação de LipC12. A utilização do *t*-butanol, um álcool terciário sem efeitos inibitórios para a lipase, para a etapa de lavagem e para solubilização do ácido oleico podem ter contribuído no aumento de atividade de LipC12 imobilizada.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram desenvolvidas estratégias de *bioimprinting* aliadas a processos de imobilização – por adsorção e por ligação covalente - tendo sido atingidos os melhores resultados de melhoramento da atividade da lipase LipC12 imobilizada por ligação covalente.

Os resultados deste trabalho mostraram que:

(I) Ensaio com LipC12 livre

- Os agentes de *bioimprinting* que proporcionaram maior ativação à LipC12 livre foram CTAB-*t*-butanol seguido das misturas CTAB-ácido oleico, na razão de 1:1 e 1:5 (lipase: ácido oleico).

(II) Ensaio com imobilização de LipC12 por adsorção hidrofóbica em Accurel MP-1000

- O processo de imobilização de LipC12 por adsorção em Accurel MP-1000 somado ao *bioimprinting*, tanto no pré-tratamento quanto no pós-tratamento, não foi efetivo para aumentar a atividade da lipase imobilizada.
- No pré-tratamento, houve interferência dos agentes de *bioimprinting* no processo de imobilização, causando diminuição da eficiência de imobilização.
- No pós-tratamento, houve diminuição da atividade de LipC12 imobilizada, possivelmente devido à lixiviação da lipase nos tratamentos em meio aquoso.

(III) Ensaio com imobilização de LipC12 por ligação covalente em Immobead 150-P

- Na imobilização de LipC12 por ligação covalente em Immobead 150-P, utilizando LipC12 purificada, o *bioimprinting* aplicado tanto no pré-tratamento como no pós-tratamento não interferiu na eficiência de

imobilização, que apresentou valores de 100% para todas as condições estudadas.

- Para a imobilização conduzida a partir de LipC12 purificada, houve ativação da enzima imobilizada, sendo que o agente de *bioimprinting* que proporcionou os maiores valores foi o ácido oleico dissolvido em *t*-butanol, na razão de 1:5 (lipase:ácido oleico), com aumento de 828% no pré-tratamento, 1210% no pós-tratamento e de 179% no pós-tratamento realizado em meio orgânico.
- Para a imobilização conduzida a partir do extrato bruto de LipC12, o ácido oleico dissolvido em *t*-butanol também foi o melhor agente de *bioimprinting*, com o maior valor de ativação (1355%) obtido com o pós-tratamento de LipC12 imobilizada, com incubação utilizando solução de ácido oleico dissolvido em *t*-butanol (147 nmol por 20 mg de proteína), seguido do pré-tratamento, com incubação utilizando solução de ácido oleico dissolvido em *t*-butanol (29,4 nmol por 20 mg de proteína), com ativação de 935%.
- LipC12 imobilizada com os tratamentos de *bioimprinting* apresentou aumento da atividade de esterificação em relação ao controle, com os maiores valores obtidos para LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto e com pré-tratamento utilizando solução de ácido oleico dissolvido em *t*-butanol (147 nmol por 20 mg de proteína), com 344% de aumento de atividade, seguido pelo pós-tratamento, na mesma condição, de LipC12 imobilizada a partir da fração purificada (312%).
- LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto, pré-tratada utilizando solução de ácido oleico dissolvido em *t*-butanol (147 nmol por 20 mg de proteína), foi estável após 10 ciclos de reuso em reações de hidrólise em meio orgânico, mantendo 100% de sua atividade inicial.
- Em todos os casos, houve aumento de atividade de esterificação de LipC12 imobilizada com aplicação de *bioimprinting*. O derivado

imobilizado obtido a partir da fração purificada que apresentou maior aumento de atividade foi o produzido com pós-tratamento em meio orgânico utilizando solução de ácido oleico dissolvido em *t*-butanol (147 nmol por 1 mg de proteína), com 312% de aumento (atividade de 144,5 U g⁻¹), equivalente a 3,1 vezes o valor do controle.

- LipC12 imobilizada a partir do extrato bruto com maior aumento da atividade de esterificação foi a pré-tratada utilizando solução de ácido oleico dissolvido em *t*-butanol (147 nmol por 20 mg de proteína), com 344% de aumento (atividade de 290,3 U g⁻¹), equivalente 3,4 vezes o valor do controle.

8 PERSPECTIVAS

A estratégia de aplicação da técnica de *bioimprinting* em conjunto aos processos de imobilização por ligação covalente se mostraram promissores, abrindo perspectivas para a aplicações em outros processos catalíticos

São sugestões para trabalhos futuros:

- Otimizar as concentrações dos agentes de *bioimprinting*, puros ou em misturas por meio de planejamento fatorial;
- Utilizar técnicas de *bioimprinting* visando aplicação em reações de interesterificação seletiva para obtenção de lipídios estruturados ou outros ésteres de interesse comercial como, por exemplo, ésteres de aromas, antioxidantes e flavonóides;
- Utilização da técnica de *bioimprinting* direcionada a reações de resolução cinética de diferentes substratos para obtenção de fármacos opticamente puros ou intermediários de síntese, que são de grande demanda na indústria farmacêutica.
- Aplicar as técnicas de *bioimprinting* na imobilização de LipC12 e de outras lipases em diferentes suportes.
- Estudar a aplicação de LipC12 imobilizada com os melhores tratamentos de *bioimprinting* em processos que requeiram altas concentrações de solventes hidrofílicos, como em sistemas livres de solventes, para a síntese de biodiesel, biolubrificantes e bioplásticos.
- Estudar o *bioimprinting* por pós-tratamento em meio orgânico, combinado à imobilização por adsorção em Accurel MP-1000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilisation: An equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 207–215, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00050-9)
2. ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R. V.; PEIXOTO, B.; et al. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 531–537, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.019>.
3. ALNOCH, R. C.; MELO, R. R. de; PALOMO, J. M.; SOUZA, E. M. de; KRIEGER, N.; MATEO, C. New tailor-made alkyl-aldehyde bifunctional supports for lipase immobilization. **Catalysts**, v. 6, n. 12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal6120191>.
4. ALNOCH, R. C.; SANTOS, L. A. DOS; DE ALMEIDA, J. M.; KRIEGER, N.; MATEO, C. Recent trends in biomaterials for immobilization of lipases for application in non-conventional media. **Catalysts**, v. 10, n. 6, p. 1–29, 2020. MDPI. <https://doi.org/10.3390/catal10060697>.
5. ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475–6490, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35484a. PMID: 23515487.
6. ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, n. 1, p. 177–183, 1999. PMID: 10493927; PMCID: PMC1220539.
7. BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015. Elsevier. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.

8. BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 2013. DOI: 10.1021/bm400762h
9. BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, n. March, p. 110607, 2019. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.
10. BOLIVAR, J. M.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 51, n. 15, p. 6251–6290, 2022. Royal Society of Chemistry. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D2CS00083K>.
11. BRANDÃO, L. M. D. S.; BARBOSA, M. S.; SOUZA, R. L.; et al. Lipase activation by molecular bioimprinting: The role of interactions between fatty acids and enzyme active site. **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 1, p. 1–9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.3064>
12. CABRERA, Z.; PALOMO, J. M. Enantioselective desymmetrization of prochiral diesters catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 22, n. 24, p. 2080–2084, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2011.11.012>.
13. CALLAGHAN, C.; REDMOND, M.; ALNOCH, R. C.; MATEO, C.; FILICE, M.; PALOMO, J. M. Biocatalytic Process Optimization for the Production of High-Added-Value 6-O-Hydroxy and 3-O-Hydroxy Glycosyl Building Blocks. **ChemCatChem**, v. 9, n. 13, p. 2536–2543, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/cctc.201601632>.
14. CAO, X.; YANG, J.; SHU, L.; YU, B.; YAN, Y. Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 177–182, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.003>.

15. CASAS-GODOY, L.; GASTEAZORO, F.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; SANDOVAL, G.; MARTY, A. Lipases: An Overview. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, **Methods in Molecular Biology**, p.3–30, 2012. New York. DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_1. PMID: 22426709.
16. CHEN, M.; HE, Y.; HE, G.; RUAN, H. The preparation of a hyperthermostable whole-cell biocatalyst and its application for biosynthesis of biodiesel. **Advanced Materials Research**, v. 550–553, p.1381–1386, Trans Tech Publications, Ltd. 2012. DOI: 10.4028/www.scientific.net/amr.550-553.1381.
17. DI COSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35506c. PMID: 23436023.
18. DIAZ-VIDAL, T.; ARMENTA-PEREZ, V. P.; ROSALES-RIVERA, L. C.; MATEOS-DÍAZ, J. C.; RODRÍGUEZ, J. A. Cross-linked enzyme aggregates of recombinant *Candida antarctica* lipase B for the efficient synthesis of olvanil, a nonpungent capsaicin analogue. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 4, 2019. John Wiley and Sons Inc. DOI: 10.1002/btpr.2807. PMID: 30883025.
19. FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. 1998. **Chem Phys Lipids**, (1-2):185-97. DOI: 10.1016/s0009-3084(98)00042-5.
20. FISHMAN, A.; COGAN, U. Bio-imprinting of lipases with fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 3–4, p. 193–202, 2003. Elsevier. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00032-8](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00032-8).
21. FORESTI, M. L.; ALIMENTI, G. A.; FERREIRA, M. L. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: Effect on the enzymatic activity in solvent-free ethyl oleate synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2–3, p. 338–349, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.012>.

22. FURUKAWA, S. Y.; ONO, T.; IJIMA, H.; KAWAKAMI, K. Effect of imprinting sol-gel immobilized lipase with chiral template substrates in esterification of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-glycidol. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 17, n. 1, p. 23–28, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(01\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00076-5).
23. GABROVSKA, K.; MARINOV, I.; GODJEVARGOVA, T.; PORTACCIO, M.; LEPORE, M.; GRANO, V.; DIANO, N.; MITA, D. G. The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 4, p. 339–345, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.07.006>.
24. GAO, J.; YIN, L.; FENG, K.; Liya Zhou, MA, .L; HE, Y.; WANG, L.; JIANG, Y. Lipase immobilization through the combination of bioimprinting and cross-linked protein-coated microcrystal technology for biodiesel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 42, p. 11037–11043, 2016. American Chemical Society. DOI: [10.1021/acs.iecr.6b03273](https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b03273)
25. GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
26. GARCÍA-URDIALES, E.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V. Kinetic Resolution of (\pm)-1-Phenylbutan-1-ol by Means of CALB-Catalyzed Aminolyses: A Study on the Role of the Amine in the Alcohol Resolution. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 343, n. 6–7, p. 646–654, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1002/1615-4169\(200108\)343:6/7<646::AID-ADSC646>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1615-4169(200108)343:6/7<646::AID-ADSC646>3.0.CO;2-A)
27. GIORDANO, R. C.; RIBEIRO, M. P. A.; GIORDANO, R. L. C. Kinetics of β -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 27–41, 2006. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2005.05.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.05.003)

28. GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G.H.; MÜLLER-SANTOS, M.; MONTEIRO, R. A.; MITCHELL, D. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microb Cell Fact** **10**, 54. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-54>
29. GONZÁLEZ-NAVARRO, H.; BRACE, L. Improving lipase activity in solvent-free media by interfacial activation-based molecular bioimprinting. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Volume 3, Issues 1–4, 1997, Pages 111-119, ISSN 1381-1177, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(96\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(96)00038-0).
30. GONZÁLEZ-NAVARRO, H.; BRACO, L. Lipase-enhanced activity in flavour ester reactions by trapping enzyme conformers in the presence of interfaces. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 1, p. 122–127, 1998. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980705\)59:1<122::aid-bit16>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980705)59:1<122::aid-bit16>3.0.co;2-k)
31. HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009. DOI: [10.1039/b711564b](https://doi.org/10.1039/b711564b)
32. HASSAN, M. E.; YANG, Q.; XIAO, Z.; LIU L, WANG N, CUI X, YANG L. Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. **3 Biotech**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2019. Springer International Publishing. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1969-0>.
33. HELLNER, G.; BOROS, Z.; TOMIN, A.; POPPE, L. Novel sol-gel lipases by designed bioimprinting for continuous-flow kinetic resolutions. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2481–2491, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/adsc.201100329>
34. HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011. Elsevier Inc. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.10.003>.

35. HILAL, N.; NIGMATULLIN, R.; ALPATOVA, A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 238, n. 1–2, p. 131–141, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.04.002>.
36. JAEGER, K.-E. E.; RANSAC, S. S.; DIJKSTRA, B. W.; HEUVEL M, an; MISSET O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994. DOI: 10.1111/j.1574-6976.
37. JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, 2018. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>.
38. KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1525–1530, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.12.002>
39. KAHVECI, D.; XU, X. Enhancement of activity and selectivity of *Candida rugosa* lipase and *Candida antarctica* lipase A by bioimprinting and/or immobilization for application in the selective ethanolysis of fish oil. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 10, p. 2065–2071, 2011. DOI: 10.1007/s10529-011-0671-z.
40. KAHVECI, D.; XU, X. Bioimprinted immobilization of *Candida antarctica* lipase A for concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 10, p. 1839–1845, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2090-2>
41. KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>.
42. KASCHE, V. Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 1, p. 4–16, 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90003-7)

43. KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 10, n. 1–3, p. 157–176, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00124-7)
44. KLOSTER, F. M. **Estudos de expressão da lipase de metagenômica LipC12 em *Pichia pastoris***. 2021. 87 f. Dissertação (Mestrado em bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2021.
45. KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 3, p. 269–278, 2006. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.05.009>.
46. KOTER, I.; CEYNOWA, J. Kinetic resolution of chiral alcohols in bifunctional membrane exhibiting enzyme activity and enantioselective permeation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 24–25, p. 17–26, 2003. Elsevier. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00068-7).
47. LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**, 1987. 30: 81-87. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.260300112>
48. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
49. LI, K.; WANG, J.; HE, Y.; CUI, G.; ABDULRAZAQ, M. A.; YAN, Y.; Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 351. 2018, p. 258–268, 2018. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.086>.
50. LINDEQUE, R. M.; WOODLEY, J. M. Reactor selection for effective continuous biocatalytic production of pharmaceuticals. **Catalysts**, v. 9, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal9030262>

51. LIU, T.; LIU, Y.; WANG, X.; LI, Q.; WANG, J.; YAN, Y. Improving catalytic performance of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on macroporous resin NKA. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 71, p. 45–50, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.03.007>.
52. LIU, Y.; GUO, C.; SUN, X. T.; LIU, C. Z. Improved performance of *Yarrowia lipolytica* lipase-catalyzed kinetic resolution of (*R,S*)-2-octanol by an integrated strategy of interfacial activation, bioimprinting and immobilization. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 415–419, 2013. Elsevier. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.045>.
53. LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. A. N. J. Rapid Colorimetric Determination of Free Fatty Acids. **Journal of the american oil chemists' society**, v. 53, p. 470–472, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02636814>
54. MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; GLOGAUER, A.; ZANIN, G. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 45–51, 2015. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.03.002>.
55. MARQUES, M. P. C.; LORENTE-AREVALO, A.; BOLIVAR, J. M. Biocatalysis in Continuous-Flow Microfluidic Reactors. **Adv Biochem Eng Biotechnol**. 2022;179:211-246. DOI: 10.1007/10_2020_160.
56. MARSDEN, S. R.; MESTROM, L.; MCMILLAN, D. G. G.; HANEFELD, U. Thermodynamically and Kinetically Controlled Reactions in Biocatalysis – from Concepts to Perspectives. **ChemCatChem**, v. 12, n. 2, p. 426–437, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/cctc.201901589>.
57. MATEO, C.; MONTI, R.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M.; TORRES, R.; GUISÁN, J. M.; LAFUENTE, R. F.; Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. **Full hydrolysis of lactose in Milk**, *Biotechnol. Prog.*, v. 20, pp. 1259-1262. 2004. DOI: 10.1021/bp049957m.

58. MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007. v 40, i 6, p 1451-1463, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>.
59. MATEO, C.; BOLIVAR, J. M.; GODOY, C. A.; PESSELA, B. C.; CURIEL, J. A.; MUÑOZ, R.; GUIBAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 3112–3117, 2010. DOI: 10.1021/bm100916r
60. MATSUMOTO, M.; HASEGAWA, Y. Enzymatic kinetics of solvent-free esterification with bio-imprinted lipase. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 33, n. 4, p. 495–499, 2020. DOI: <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2019.1692>
61. MATSUMOTO, M.; NAKAO, K.; TAHARA, Y. Effects of imprinting and water activity on transesterification and thermostability with lipases in ionic liquid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 35, n. 1, p. 57–63, 2021. DOI: <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2020.1899>.
62. MINGARRO, I.; ABAD, C.; BRACO, L. Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes (lipases/phospholipase A2/nonaqueous media). **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.8.3308.
63. MUKHERJEE, J.; GUPTA, M. N. Dual bioimprinting of *Thermomyces lanuginosus* lipase for synthesis of biodiesel. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 38–43, 2016a. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.02.005>.
64. MUKHERJEE, J.; GUPTA, M. N. Lipase coated clusters of iron oxide nanoparticles for biodiesel synthesis in a solvent free medium. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 166–171, 2016b. Elsevier. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.134>.

65. MUKHERJEE, J.; GUPTA, M. N.; NATH, M. Molecular bioimprinting of lipases with surfactants and its functional consequences in low water media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 544–551, 2015. DOI: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813015005772>.
66. MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 2, p. 57–66, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02935881>
67. PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2002. v 19-20, p 279-286. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00178-9)
68. PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: Complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2–3, p. 199–205, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00120-0).
69. RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>
70. RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

71. SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1–2, p. 1–9, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.05.003>
72. SAMPATH, C.; BELUR, P. D.; IYYASAMI, R. Enhancement of n-3 polyunsaturated fatty acid glycerides in Sardine oil by a bioimprinted cross-linked *Candida rugosa* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 110, 2018, p. 20–29, 2018. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.003>.
73. SÁNCHEZ, D. A.; ALNOCH, R. C.; TONETTO, G. M.; KRIEGER, N.; FERREIRA, M. L. Immobilization and bioimprinting strategies to enhance the performance in organic medium of the metagenomic lipase LipC12. **Journal of Biotechnology**, v. 342, p. 13–27, 2021. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2021.09.022](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.022)
74. SANTOS, L. A. DOS. Imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* em suportes à base de quitosana e amido polialdeídico para utilização em biocatálise, 2021. 98f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Exatas de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR) 2021.
75. SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and α/β hydrolase fold. **Methods in Enzymology**, v. 284, n. 1973, p. 85–107, 1997. DOI: [10.1016/s0076-6879\(97\)84006-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)84006-2)
76. SHELDON, R. A.; BASSO, A.; BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: Robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 10, p. 5850–5862, 2021. Royal Society of Chemistry. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1CS00015B>
77. SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.; Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).

78. STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 168, n. 3, p. 1070–1074, 1986. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096967>.
79. SU, F.; LI, G.; ZHANG, H.; YAN, Y. Enhanced performance of *Rhizopus oryzae* lipase immobilized on hydrophobic carriers and its application in biorefinery of rapeseed oil deodorizer distillate. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 3, p. 935–945, 2014. Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9415-y>
80. TAVANO, O. L.; BERENQUER-MURCIA, A.; SECUNDO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>
81. TISS, A.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36–43, 2001. DOI: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326970195095X>.
82. VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; HIRATA, D. B.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 30–35, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.010>.
83. XU, M. Q.; WANG, S. S.; LI, L. N.; GAO, J.; ZHANG, Y. W. Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, p. 1–20, 2018. DOI: 10.3390/catal8100460
84. WANG, R.; ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Activation of enzyme nanogel in organic solvents by PEG-substrate joint imprinting. **RSC Advances**, v. 4, n. 76, p. 40301–40304, 2014. Royal Society of Chemistry. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA06660J>.

85. WANG, R.; ZHANG, Y.; HUANG, J.; LU, D.; GE, J.; LIU, Z. Substrate imprinted lipase nanogel for one-step synthesis of chloramphenicol palmitate. **Green Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 1155–1158, 2013. Royal Society of Chemistry. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3GC40465J>
86. WEISER, D.; SÓTI, P. L.; BÁNÓCZI, G.; BÓDAI, V.; KISS, B.; GELLÉRT, A.; NAGY, Z. K.; KOCZKA, B.; SZILÁGYI, A.; MAROSI, G.; POPPE, L. Bioimprinted lipases in PVA nanofibers as efficient immobilized biocatalysts. **Tetrahedron**, v. 72, n. 46, p. 7335–7342, 2016. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.06.027>.
87. WU, S.; SNAJDROVA, R.; MOORE, J. C.; BALDENIUS, K.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 60, n. 1, p. 88–119, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>.
88. WULFF, G. Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates. **Angewandte Chemie**, 11:341. 1972.
89. YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, n. 1–3, p. 215–222, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.07.018>.
90. YAN, J.; LI, L.; TANG, Q.; JIANG, M.; JIANG, S. Preparation of a crosslinked bioimprinted lipase for enrichment of polyunsaturated fatty acids from fish processing waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 757–765, 2010. DOI: [10.1007/s12010-010-8910-7](https://doi.org/10.1007/s12010-010-8910-7)
91. YAN, J. Y.; YAN, Y. J.; YANG, J. K.; XU, L.; LIU, Y. Combined strategy for preparation of a bioimprinted *Geotrichum sp.* lipase biocatalyst effective in non-aqueous media. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1128–1132, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.008>.
92. YAN, Y.; ZHANG, X.; CHEN, D. Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 179–187, 2013. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.092>.

93. YANG, H.; ZHANG, W. Surfactant imprinting hyperactivated immobilized lipase as efficient biocatalyst for biodiesel production from waste cooking oil. **Catalysts**, v. 9, n. 914, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal9110914>
94. YANG, J.; LIU, L.; CAO, X. Combination of bioimprinting and silane precursor alkyls improved the activity of sol-gel-encapsulated lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3–4, p. 257–261, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.004>.
95. YAO, X.; WANG, N.; FANG, Y.; PHILLIPS, G., O.; JIANG, F.; HU, J.; LU, J.; XU, Q.; TIAN, D. Impact of surfactants on the lipase digestibility of gum arabic-stabilized O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 393–401, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.013>.
96. YILMAZ, E. Bio-imprinting of microbial lipase at air-water interface. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 18, 141–145. 2002a. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1014401027903>.
97. YILMAZ, E. Improving the application of microbial lipase by bio-imprinting at substrate-interfaces. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 37–40, 2002b. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1013917611796>
98. YILMAZ, E. Combining the bioimprinting technique with lipase immobilization for interesterification. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 621–625, 2002c. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016855931559>
99. YILMAZ, E. Orlistat-induced molecular bio-imprinting of microbial lipase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 19, 161–165. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1023216301165>