

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**SUPORTES HÍBRIDOS MODIFICADOS COM LÍQUIDOS  
IÔNICOS PRÓTICOS PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE**

Autor: Sílvia Regina Soares Martins

Orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Rebeca Cabrera Padilla, D.Sc.

Prof<sup>ª</sup>. Cleide Mara Faria Soares, D.Sc.

ARACAJU, SE - BRASIL

MARÇO DE 2016

SUPORTES HÍBRIDOS MODIFICADOS COM LÍQUIDOS IÔNICOS  
PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

Sílvia Regina Soares Martins

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

Aprovada por:

---

Rebeca Yndira Cabrera-Padilla, D.Sc.

---

Cleide Mara Faria Soares, D.Sc.

---

Ranyere Lucena de Souza, D.Sc.

---

Felipe Korbus Sutili, D.Sc.

ARACAJU, SE – BRASIL

MARÇO DE 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Silvia Regina Soares

S676s Suportes híbridos modificados com líquidos iônicos próticos para  
imobilização da lipase/ Sílvia Regina Soares Martins; orientação [de] Prof<sup>a</sup>.  
Rebeca Cabrera Padilla, Prof<sup>a</sup>. Cleide Mara Faria Soares. - - Aracaju, SE:  
UNIT. 2016.

78 p.: i l.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)

– Universidade Tiradentes, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Lipase. 2. Imobilização. 3. Suporte híbrido. 4. Líquidos  
iônicos próticos. I. Padilla, Rebeca Cabrera. II. Soares, Cleide Mara Faria.  
III. Universidade Tiradentes - UNIT. IV. Título.

CDU 66-911.4

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.*  
*(Albert Einstein)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado força em todos os momentos de dificuldade.

À minha filha Júlia, por ser minha maior motivação e por trazer-me tantos momentos de amor, alegria e felicidade.

À minha mãe, Aline, meu exemplo de vida, e minha irmã, Juliane, pelo carinho, incentivo e amor, estando sempre presentes me apoiando e ajudando em todos os momentos de minha vida.

As minhas orientadoras Rebeca Cabrera-Padilla e Cleide Mara Soares, a oportunidade e apoio na realização deste projeto de dissertação.

As minhas alunas de iniciação científica Andressa Resende de Jesus, Amanda dos Santos e Sabrina Ferreira da Silva Lima pela grande ajuda durante a pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em engenharia de processos/UNIT pelas contribuições transmitidas para o aperfeiçoamento dos meus conhecimentos.

A todos os amigos do PEP e PBI pela troca de conhecimento, pelos momentos de descontração vividos todos os dias. Em especial, ao Anderson pela força dada em toda essa jornada e pela disposição em ajudar sempre.

À Universidade Tiradentes e ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa, pela possibilidade de realização desse trabalho.

À FAPITEC, pelo apoio financeiro.

A minha filha Júlia Louise Martins Oliveira, aos meus pais José Santana Martins (in memorian) e Aline Soares Martins, minha irmã Juliane Soares Martins e meu cunhado, Brejnev Santana, sempre presentes na minha vida, me incentivando e me apoiando em tudo que faço.

Dedico esse trabalho.

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

## SUPORTES HÍBRIDOS MODIFICADOS COM LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

Sílvia Regina soares Martins

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso de líquidos iônicos próticos (LIPs): propanoato, butanoato e pentanoato de N-metilmonoetanolamina (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>) na preparação de suportes híbridos constituídos por hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) e sílica para imobilização da Lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) por ligação covalente utilizando epiclorigrina como agente bifuncional. Para os biocatalisadores imobilizados (BIs) foram avaliados os rendimentos de imobilização e a caracterização bioquímica (pH, temperatura, estabilidade térmica e operacional) definindo a melhor condição. Para os suportes e o biocatalisador imobilizado (BI) mais eficiente foram realizadas a caracterização morfológica e físico-química (MEV, BET, FTIR e TGA). Além disso, foram realizados ensaios de estabilidade em diferentes solventes (etanol e ciclohexano). Para a preparação do suporte híbrido, o ensaio realizado com 3 g de PHBV apresentou cerca de 50% de recuperação de massa adquirida do suporte na granulometria desejada. O rendimento de imobilização (RI) dos BIs em suportes híbridos modificados com líquidos iônicos (LIs) BI-C<sub>3</sub> (103%), BI-C<sub>4</sub> (120%) e BI-C<sub>5</sub> (135%) foram superiores ao controle (90%), sendo o mais eficiente BI-C<sub>5</sub>, o qual apresentou melhor estabilidade térmica e operacional. Os resultados mostraram que o líquido iônico de maior tamanho de cadeia alquílica (C<sub>5</sub>) influenciou positivamente na atividade do BI. Esse comportamento é devido ao aumento da hidrofobicidade nos LIPs com maiores cadeias alquílicas, verificando-se também os maiores RI dos BIs em todos os suportes em estudo modificados pelo C<sub>5</sub>, quando comparado com os BIs em suporte controle. Do ponto de vista estrutural, a adição do Líquido iônico (LI) na preparação do suporte híbrido provocou um aumento significativo na área de superfície e no volume do poro.

Palavras-chave: Lipase, Imobilização, Suporte híbrido, Líquidos iônicos próticos.

Abstract from the essay presented to the Post Graduation Program in Processes Engineering of Tiradentes University as part of the requirements for obtaining the Master Degree in Processes Engineering

## MODIFIED HYBRID SUPPORTS WITH IONIC LIQUIDS FOR LIPASE IMMOBILIZATION

Silvia Regina Soares Martins

This work aimed to assess the use of protic ionic liquids (PILs): propanoate, butanoate and N-metilmonoetanamina pentanoate (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>) in the preparation of hybrid supports made of hydroxibutirato-co-hidroxi valerato (PHBV) and silica for immobilization of Lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL) by covalent bond using epichlorohidrina as a bifuncional agente. For the immobilized biocatalysts (IBs), it was determined the performance of immobilization and the biochemical characterization (pH, thermal and operational stability) defining the best condition. For the most efficient supports and immobilized biocatalyst (IB), it was made the morphological and physicochemical characterization (MEV, BET, FTIR and TGA). Besides that, it was made experiments on the stability of different solvents (ethanol e ciclohexano). For the preparation of the hybrid support, the experiment was performed using 3g of PHBV, around 50% of recovering of acquired mass of the support in the desired granulometry. The immobilization yields from the IBs in modified hybrid supports in ionic liquids BI-C<sub>3</sub> (103%), BI-C<sub>4</sub> (120%) and BI-C<sub>5</sub> (135%) were above the control (90%), being IB-C<sub>5</sub> the most efficient, which presented better thermal and operational stability. The yields showed that the bigger the size of the protic ionic liquid (LIP) alkyl chain the more positively it influences the IB activity. This behavior is confirmed with the increase of hydrophobicity in the LIPs with longer alkyl chains, and it was also verified the biggest immobilization yields IBs in all the supports in study modified by C<sub>5</sub>, when compared with the IBs in control support. From a structural point of view, the addition of ionic liquid (IL) in the preparation of the hybrid support caused a significant increase in surface area and pore volume.

Key words: Lipase, immobilization, covalent bond, hybrid support, protic ionic liquids.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>4</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
3.1 ENZIMAS.....	5
3.2 LIPASES .....	7
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	11
3.3.2 Imobilização por ligação covalente.....	13
3.4 SUPORTES HÍBRIDOS.....	17
3.5 ADITIVOS UTILIZADOS NOS PROCESSOS DE IMOBILIZAÇÃO .....	21
<b>4. ARTIGO.....</b>	<b>28</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>55</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....</b>	<b>64</b>
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>65</b>
LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS .....	65

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES (GHANEM, 2007). .....	10
FIGURA 2: ESTRUTURA DA LIPASE DE BURKHOLDERIA CEPACIA. A TAMPA DA ESTRUTURA CRISTALINA ABERTA ESTÁ REPRESENTADA NA COR AZUL E MODELO FECHADO NA COR VERDE, A ESFERA DO ÍON $Ca^{2+}$ É DE COR AMARELA. A TRIÁDE CATALÍTICA QUE CONSISTE EM SER, HIS E ASP É DE COR VERMELHA. FONTE: TRODLER ET AL., 2009. ....	11
FIGURA 3: DIVERSAS TÉCNICAS PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS. FONTE: (ADAPTADO DE ZHAO ET AL., 2015). ....	12
FIGURA 4: REAÇÃO DE SUPORTES AMINOPROPILADOS PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE, USANDO O GLUTARALDEÍDO COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO. FONTE: CARDOSO ET AL., 2009. ....	13
FIGURA 5: IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE: (A) SILANIZAÇÃO, (B) ADIÇÃO DO REAGENTE ESPAÇADOR, REAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO. FONTE: CARDOSO ET AL., 2009. ..	13
FIGURA 6: REAÇÕES DE SUPORTES AMINOPROPILADOS PARA IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE, USANDO COMO AGENTES ATIVADORES (A) O CARBONATO DE N-N'-DISUCCINIMIDIL (DSC) E (B) O SUBERATO DE N-N'-DISUCCINIMIDILA (DSS). FONTE: CARDOSO ET AL., 2009. ....	14
FIGURA 7: ATIVAÇÃO DE SUPORTE DE SÍLICA COM DIFERENTES GRUPOS BIFUNCIONAIS. FONTE: CARVALHO ET AL., 2014. ....	15
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ATAQUE COVALENTE DE LIPASE EM UM SUPORTE QUIMICAMENTE ATIVADO CONTENDO UM ESPAÇADOR. UM GRUPO AMINO DA ENZIMA PODE ATACAR UM GRUPO REATIVO NO SUPORTE ATIVADO. ....	15
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO DOS TIPOS DE SUPORTE HÍBRIDOS. FONTE: BENVENUTTI ET AL., 2009. ....	21
FIGURA 10: ESTRUTURAS QUÍMICAS E RESPECTIVAS ABREVIATURAS DE ALGUNS LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS. FONTE: OLIVEIRA ET AL., 2016. ....	25
FIGURA 11: ESTRUTURAS QUÍMICAS E NOMENCLATURAS E ABREVIATURAS DE ALGUNS LÍQUIDOS IÔNICOS APRÓTICOS. FONTE: CABRERA-PADILLA ET AL., 2014. ....	26

## ARTIGO

<b>FIGURE 1: PREPARATION OF HYBRID SUPPORT WITH DIFFERENT MASS RATIO (G OF PHBV:G OF HYBRID).....</b>	<b>39</b>
<b>FIGURE 2: STUDY OF IMMOBILIZATION YIELDS FOR BCL IMMOBILIZED IN PHBV, SILICA AND SUPPORT HYBRID (CONTROL) AND THE MODIFIED WITH PIL (IB-C3), (IB-C4) E (IB-C5). .....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURE 3: ACTIVITY EFFECT ON (A) PH AND (B) TEMPERATURE OF BIOCATALYSTS IMMOBILIZED IN THE HYBRID SUPPORTS (IB CONTROL) AND MODIFIED WITH PROTIC IL (IB-HYBRID-C<sub>3</sub>), (IB-HYBRID-C<sub>4</sub>) AND (IB- HYBRID- C<sub>5</sub>).....</b>	<b>41</b>
<b>FIGURE 4: THERMAL STABILITY TESTS FOR BURKHOLDERIA CEPACIA LIPASE IMMOBILIZED IN THE HYBRID SUPPORTS: A) TEMPERATURE (55°C) IB-HYBRID-CONTROL(55°C) AND MODIFIED WITH PIL IB-HYBRID-C3 (55°C), IB-HYBRID-C4(55°C) AND IB-HYBRID-C5(55°C), B) AT 65°C, IB-HYBRID-CONTROL (65°C) AND MODIFIED WITH PIL IB-HYBRID-C3 (65°C). .....</b>	<b>42</b>
<b>FIGURE 5: OPERATIONAL STABILITY TESTS FOR BURKHOLDERIA CEPACIA LIPASE IMMOBILIZED IN THE HYBRID SUPPORTS (IB-HYBRID-CONTROL) AND MODIFIED WITH PROTIC (IB-HYBRID-C<sub>3</sub>), (IB-HYBRID-C<sub>4</sub>) AND (IB-HYBRID-C<sub>5</sub>).....</b>	<b>43</b>
<b>FIGURE 6: STABILITY AT SOLVENT FOR BURKHOLDERIA CEPACIA LIPASE IMMOBILIZED IN THE HYBRID SUPPORTS (IB-HYBRID-CONTROL) AND IN THE HYBRID SUPPORTS MODIFIED WITH PIL (IB-HYBRID-C<sub>3</sub>), (IB-HYBRID-C<sub>4</sub>) AND (IB-HYBRID-C<sub>5</sub>) FOR (A) CYCLOHEXANE E (B) ETHANOL. ....</b>	<b>44</b>
<b>FIGURE 7: SAMPLE MICROGRAPHS, SUPPORT (SILICA-CONTROL), SUPPORT (PHBV-CONTROL), HYBRID SUPPORT (HYBRID-CONTROL), SUPPORT HYBRID WITH IONIC LIQUID C<sub>5</sub> (HYBRID-C<sub>5</sub>), BIOCATALYST IMMOBILIZED ON HYBRID SUPPORT (IB-HYBRID-CONTROL) E BIOCATALYST IMMOBILIZED ON HYBRID SUPPORT WITH IONIC LIQUID C<sub>5</sub> (IB-HYBRID-C<sub>5</sub>).....</b>	<b>45</b>
<b>FIGURE 8: FTIR SPECTRA (A) SUPPORTS (PHBV-CONTROL, SILICA-CONTROL, HYBRID-CONTROL, HYBRID-C<sub>5</sub>) AND (B) FREE ENZYME (BCL), BIOCATALYSTS IMMOBILIZED (IB- HYBRID-CONTROL AND IB-HYBRID-C<sub>5</sub>).....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURE 9: SILICA-CONTROL CURVES: TGA (CONTINUOUS LINE, [A]) AND DTG (DASHED LINE, [C]) AND PHBV-CONTROL: TGA (CONTINUOUS LINE, [B]) AND DTG (DOTTED LINE, [D]).....</b>	<b>47</b>
<b>FIGURE 10: THE CURVES OF HYBRID-CONTROL: TGA (CONTINUOUS LINE, [A]) AND DTG (DASHED LINE, [C]) AND OF HYBRID-C<sub>5</sub>: TGA (CONTINUOUS, [B]) AND E DTG (DOTTED LINE, [D]).....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURE 11. THE CURVES OF IB-HYBRID-CONTROL: TGA (CONTINUOUS LINE, [A]) AND DTG (DASHED LINE, [C]) AND OF IB-HYBRID-C<sub>5</sub>: TGA (CONTINUOUS LINE, [B]) AND DTG (DOTTED LINE, [D]).....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE ENZIMAS (NELSON, 2006).....	7
TABELA 2: MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES E SUAS RESPECTIVAS EMPRESAS (JAEGER E REETZ, 1998).....	8
TABELA 3: EXEMPLOS DE APLICAÇÕES DE LIPASE NA INDÚSTRIA (SANTOS, 2012).....	9
TABELA 4: IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE DIFERENTES FONTES POR DIFERENTES MÉTODOS. ....	16
TABELA 5: TIPOS E CLASSIFICAÇÃO DE SUPORTES UTILIZADOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E PROTEÍNAS. ....	18
TABELA 6: UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS NA SÍNTESE DE BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS EM MATRIZES HIDROFÓBICAS DE SÍLICA APLICADOS EM DIVERSAS REAÇÕES.....	23
TABELA 7: TIPOS DE LÍQUIDOS IÔNICOS UTILIZADOS EM DIVERSOS TRABALHOS ENVOLVENDO AGENTES BIOLÓGICOS.....	24

## ARTIGO

TABLE 1: STRUCTURE OF PROTIC IONIC LIQUID USED IN THIS WORK.....	34
TABLE 2: STRUCTURAL PROPERTIES OF SUPPORTS (PHBV-CONTROL, SILICA-CONTROL, HYBRID-CONTROL AND HYBRID-C <sub>5</sub> ) AND IMMOBILIZED BIOCATALYST (IB-HYBRID-C <sub>5</sub> ).....	46
TABLE 3: TOTAL AND PARTIAL MASS LOSS OBSERVED IN SUPPORTS CONTROL (PHBV-CONTROL AND SILICA-CONTROL) HYBRID SUPPORTS (HYBRID-CONTROL AND HYBRID-C <sub>5</sub> ) AND BIOCATALYSTS IMMOBILIZED (IB-HYBRID-CONTROL AND IB-HYBRID-C <sub>5</sub> ).....	48

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

Um desafio para as indústrias química, farmacêutica, alimentícia, entre outras, é a utilização de processos verdes afim de evitar ou minimizar a geração de resíduos e a utilização de materiais tóxicos e/ou perigosos (ZIVKOVIĆ *et al.*, 2014). Uma alternativa para a redução desses impactos é o uso de enzimas como biocatalisadores por possuir elevado potencial catalítico e se destacar pelas características específicas tais como a facilidade de produção a partir de recursos renováveis, a sua seletividade e especificidade, condições de reação suaves e baixo consumo de energia (SHELDON *et al.*, 2011). Porém a utilização de enzimas em larga escala é limitada, pois a sua recuperação pode ser difícil devido a sua solubilidade em meio aquoso, tornando-as relativamente instáveis (ZHAO *et al.*, 2015). Partindo desse pressuposto, a utilização de enzimas imobilizadas pode aumentar a eficiência catalítica da enzima, possibilitando também uma melhor estabilidade operacional e facilidade de armazenamento e manuseio em relação a sua forma nativa e reduzindo os custos do processo através de sua reutilização (BARBOSA *et al.*, 2014).

Enzimas imobilizadas são utilizadas frequentemente na indústria, especialmente para a síntese de produtos químicos finos, farmacêuticos, entre outros. Os avanços na tecnologia demanda de novos materiais ou melhorias dos materiais existentes e tradicionais para sua utilização como suportes na imobilização de enzimas. Um exemplo de uma abordagem que leva a novos materiais é a síntese de materiais híbridos inorgânico-orgânicos através da combinação de polímeros e de sílica (JEON *et al.*, 2009; ARAKAWA *et al.*, 2006). Os híbridos são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações (JOSE *et al.*, 2005). Nos últimos anos, os pesquisadores do Laboratório de Bioprocessos e do Laboratório de Pesquisa em Alimentos do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, têm investigado o potencial catalítico de lipases imobilizadas em suportes orgânicos e inorgânicos modificados com líquidos iônicos ou outros aditivos, tendo como objetivo global desenvolver a tecnologia de obtenção de biocatalisadores ativos e estáveis para a aplicação em reações típicas das lipases. A

principal ênfase é a produção de lipase imobilizada com boa atividade e estabilidade afim de se aplicar em processos industriais.

Os suportes inorgânicos, a exemplo da sílica ( $\text{SiO}_2$ ), se destacam por possuir elevado potencial de aplicação para imobilização de enzimas, por apresentar uma série de características como a possibilidade de modificação da superfície, estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica e é um dos materiais multifuncionais mais descritos na literatura (BENVENUTTI *et al.*, 2009). A sílica pode ser combinada com diversos compostos orgânicos ou inorgânicos apresentando novas propriedades físico-químicas ampliando suas aplicações. A literatura contém um número de exemplos bem sucedidos de combinações de sílica com outros óxidos inorgânicos, íons metálicos ou polímeros. Recentemente, tem-se verificado a possibilidade de obtenção de biomateriais multifuncionais de sílica combinada com polímeros naturais para a imobilização de enzimas, isto é, suportes híbridos (NOWACKA *et al.*, 2013).

Os materiais híbridos podem ser de origem orgânico-inorgânicos e são constituídos pela combinação dos componentes orgânicos e inorgânicos que, normalmente, apresentam propriedades complementares, dando origem a um único material com propriedades diferenciadas daquelas que lhe deram origem (JOSE *et al.*, 2005).

O uso de suportes orgânicos, dentre eles, o polímero poli (3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) tem se destacado devido as características específicas, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade e agente encapsulante (CABRERA-PADILLA *et al.*, 2011). Neste sentido, os polímeros ganham destaque devido à possibilidade de sua utilização como agente estabilizante de biocompostos, como enzimas (FERNANDES *et al.*, 2014). O potencial do uso do PHBV como suporte na imobilização das lipases de *Candida rugosa* (LCR) e *Bacillus* sp. (ITP-001) foi relatado por CABRERA-PADILLA *et al.* (2011) e CABRERA-PADILLA *et al.* (2013).

Uma das alternativas para a obtenção de biocatalisadores mais eficientes é o uso de líquidos iônicos como aditivos na imobilização ou na preparação dos suportes. Os líquidos iônicos (LI's) são classificados em próticos e apróticos e são sais com baixo ponto de fusão, normalmente abaixo dos  $100^\circ\text{C}$ , tornando-os líquidos a temperatura ambiente (NAUSHAD *et al.*, 2012; ZHAO 2010), são também considerados solventes verdes por possuírem propriedades específicas tais como baixa pressão de vapor, excelente potencial de solvatação, não-inflamáveis e possuir excelente estabilidade térmica e química (GAO *et al.*, 2015).

Segundo CABRERA-PADILLA *et al.* (2014), o uso dos líquidos iônicos apróticos como aditivos podem estabilizar enzimas no processo de imobilização atuando na proteção da camada de hidratação ao redor da enzima e/ou causando mudanças conformacionais na sua estrutura durante o processo de imobilização da lipase em PHBV (CABRERA-PADILLA *et al.*, 2014; CABRERA-PADILLA *et al.*, 2015). Portanto, até o presente momento, verificou-se apenas o potencial do uso do líquido iônico aprótico, para o suporte PHBV. Contudo ainda não foi verificado a influência do líquido iônico prótico com diferentes cadeias carbônicas para síntese do suporte híbrido e a imobilização por ligação covalente. Apesar de possuírem algumas desvantagens quando comparados a outros LI's (condutividade e estabilidade mais baixas), os LIP apresentam qualidades que superam essas limitações tais como síntese e método de purificação simples, ótima biodegradabilidade, baixa toxicidade e, principalmente, baixo custo, despertando maior interesse industrial (MATTEDI *et al.*, 2011).

Especialmente, no caso do uso do suporte PHBV e sílica, o grupo possui publicações, contudo ainda não foi avaliado o híbrido desses dois suportes. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo preparar biocatalisadores imobilizados em suportes híbridos a base de um composto orgânico – PHBV e um composto inorgânico – sílica, utilizando como aditivos os líquidos iônicos próticos, imobilizar a LBC por ligação covalente e caracterizar as propriedades bioquímicas, físico-químicas e morfológicas dos suportes modificados e dos biocatalisadores imobilizados.

# Capítulo 2

## 2. OBJETIVO

### 2.1 *Objetivo Geral*

Estudar a influência dos líquidos iônicos próticos na preparação do suporte híbrido constituído por PHBV e sílica para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- ✓ Determinar a proporção dos constituintes do suporte híbrido;
- ✓ Imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* nos suportes híbridos pelo método de ligação covalente.
- ✓ Avaliar o rendimento de imobilização na reação de hidrólise dos biocatalisadores imobilizados nos suportes na ausência de líquidos iônicos (controle) e modificados com líquidos iônicos próticos;
- ✓ Realizar a caracterização bioquímica (pH, temperatura, estabilidade térmica, operacional e em solventes) da Lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada no suporte controle e modificados com líquidos iônicos;
- ✓ Caracterizar os suportes e o biocatalisador imobilizado pelas técnicas de: Adsorção e dessorção de nitrogênio - BET; Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV; Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR e Termogravimetria – TG.



## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Enzimas

O crescimento da biocatálise no Brasil é estrategicamente favorável para o desenvolvimento de processos biotecnológicos. A aplicação da tecnologia enzimática permite conciliar o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e com a preservação ambiental, que é uma questão fundamental para a sustentabilidade das atividades produtivas e contribui para uma forte representatividade brasileira no cenário internacional. Atualmente, são o principal alvo das pesquisas em biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (BON *et al.*, 2008; KAPOOR; GUPTA, 2012). A busca por tecnologias “limpas” e processos mais sofisticados vem estimulando o uso de enzimas em diversos setores industriais pela alta qualidade dos produtos obtidos em função da alta especificidade das enzimas, formando menos subprodutos indesejáveis, e utilizando condições mais amenas de temperatura e pressão (MATEO *et al.*, 2007).

As enzimas são proteínas formadas por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas, onde sua conformação e a estabilização da estrutura molecular são asseguradas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. As condições de pH, temperatura e força iônica do meio afetam a estrutura da enzima e conseqüentemente suas propriedades. Essas proteínas possuem atividade catalítica que exercem a função de acelerar ou possibilitar reações entre os componentes químicos. Estão presentes em todos os sistemas biológicos e são produzidas por todos os organismos vivos (LIMA *et al.*, 2001; KAPOOR; GUPTA, 2012).

A função da enzima durante uma reação é diminuir a energia de ativação, propiciando assim a ocorrência da reação com menor tempo. A parte significativa da energia usada para aumentar a velocidade enzimática é derivada das interações (pontes de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas) entre o substrato e a enzima. Além desta propriedade, as enzimas também se caracterizam por não serem desativadas durante a

reação e não alterarem o equilíbrio químico das reações (CABRAL *et al.*, 2003, NELSON *et al.*, 2006).

A reação catalítica ocorre no sítio ativo da enzima e, normalmente, em várias etapas. Desconsiderando a transferência de massa, a primeira etapa é a ligação do substrato à enzima, a qual ocorre devido às interações altamente específicas entre o substrato e as cadeias laterais dos aminoácidos que constituem o sítio ativo. Dois modelos importantes foram desenvolvidos para descrever o processo de ligação. O primeiro deles, o modelo chave-fechadura, no qual assume um alto grau de complementaridade entre a forma do substrato e a geometria do sítio de ligação da enzima. Este modelo, atualmente é de interesse histórico, uma vez que não leva em conta uma propriedade importante das proteínas, ou seja, sua flexibilidade conformacional. O segundo modelo leva em consideração a flexibilidade tridimensional da enzima. O modelo sugere um encaixe induzido, ou seja, o sítio ativo tem uma forma tridimensional diferente antes da ligação ao substrato, ocasionado pela ligação do substrato a enzima, o que resulta em um encaixe complementar ao substrato (BON *et al.*, 2008).

A catálise enzimática é caracterizada por boa capacidade de regular a atividade sob ação de efeitos ativadores e inibidores e alta especificidade de substrato, ou seja, seletividade com relação a ligações específicas do substrato, proporcionando maiores rendimentos de reação e formando produtos seletivamente. Essas vantagens implicam em produto final com quantidades mínimas de subprodutos derivados de reações secundárias, garantindo benefícios econômicos e ambientais. Outras vantagens do ponto de vista industrial, são as condições brandas de temperatura, pressão e pH, que as enzimas operam, o que contribui para economia de energia e, adicionalmente, as enzimas são biodegradáveis. Contudo, essas características tornam os catalisadores biológicos superiores em contraste com os catalisadores químicos convencionais como: ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos (BON *et al.*, 2008; KRAJEWSKA, 2004).

As enzimas são classificadas por meio das suas propriedades catalíticas, podendo ser: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, como mostra a Tabela 1 (NELSON *et al.*, 2006). Para especificar o tipo de reação e a natureza química dos reagentes, essas classes são posteriormente divididas em subclasses. Com essas características pré-definidas, um número código (EC) foi normatizado pela *Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry* (ROSEVEAR *et al.*, 1987).

**Tabela 1:** Classificação internacional de enzimas (NELSON, 2006).

<i>Nº</i>	<i>Classe</i>	<i>Tipo de reação catalisada</i>
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de hidrogênio)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais da água)
4	Liasas	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de moléculas para produzir formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N pelas reações de consideração acopladas à clivagem do ATP

De forma geral, as características enzimáticas associadas à sua ampla variedade (acilases, oxidases, proteases, amilases, celulasas, lipases, dentre outras) vem despertando um crescente interesse nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia. Dentre estas, as lipases destacam-se cada vez mais no cenário da biotecnologia, devido à sua eficiência catalítica, estabilidade e propriedades químicas (VILLENEUVE, 2000; CASTRO *et al.*, 2004).

### 3.2 Lipases

As lipases podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, atuando como enzimas digestivas na grande parte deles. Do ponto de vista industrial as lipases microbianas são consideradas de maior importância porque apresentam procedimentos simples de obtenção, a exemplo a obtenção a partir do caldo fermentativo e são mais estáveis possuindo propriedades mais diversificadas (GANDRA *et al.*, 2008; BON *et al.*, 2008)

As lipases microbianas podem ser produzidas por diversos micro-organismos como as bactérias *Bacillus* sp., *Candida rugosa*, *Candida antartica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, fungos *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor*, *Geotrichum* sp., e leveduras *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. (BON *et al.*, 2008). Atualmente, o aumento da comercialização das lipases deve-se, dentre outros motivos, ao interesse de muitas indústrias e diversas instituições de pesquisa ou unidades

experimentais. A Tabela 2 apresenta diversos micro-organismos produtores de enzimas e as respectivas empresas comercializadoras.

**Tabela 2:** Micro-organismos produtores de lipases e suas respectivas empresas (JAEGER e REETZ, 1998).

<b>Micro-organismos produtores</b>	<b>Empresas comercializadoras</b>
<i>Burkholderia cepacia</i>	Fluka, Biocatalysts, Amano, Boehringer Mannheim
<i>Candida antarctica A/B</i>	Novozymes, Boehringer Mannheim
<i>Candida rugosa</i>	Amano, Biocatalysts, Sigma, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Asahi, Biocatalysts
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Genencor
<i>Rhizomucor miehei</i>	Amano, Biocatalysts, Novozymes
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Novozymes

As lipases são definidas por sua capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicéris de longa cadeia acila com a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos, atuando numa interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. Porém, em baixas concentrações de água, as lipases podem catalisar a síntese e a transesterificação de ésteres (KAPOOR e GUPTA, 2012). Dentre as lipases mais comuns, temos a lipase de *Burkholderia cepacia* é uma das lipases mais populares usadas em síntese orgânica sendo bastante utilizadas nas reações de hidrólise e transesterificação além de apresentar capacidade em catalisar reações em meios não aquosos (NOUREDDINI *et al.*, 2005). A Figura 1 ilustra várias reações que podem ser catalisadas por lipases.

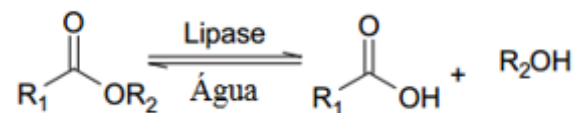
Na Tabela 3 pode-se observar as mais diversas áreas que a lipase na forma livre é utilizada no setor alimentício e químico (SANTOS, 2012).

**Tabela 3:** Exemplos de aplicações de lipase na indústria (SANTOS, 2012).

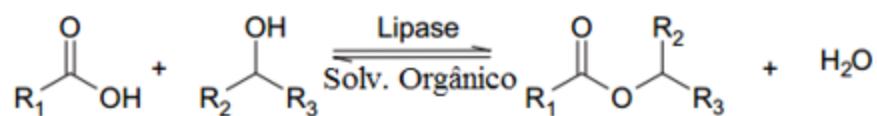
Indústria	Área	Efeito utilizado	Produto
Alimentos	Laticínios	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para produtos lácteos
	Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação (remoção dos lipídios)	Bebidas alcólicas
	Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais Hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas
Química	Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
	Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gordura	Gorduras
	Farmacêuticos	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
	Analítico	Análise de triacilglicerol no sangue	Diagnóstico
	Cosmético	Remoção de lipídios	Cosméticos em geral
	Curtume	Remoção de gorduras da peles de animais	Produtos de couro

Dentre as diversas lipases, a lipase da *Burkholderia cepacia* é bastante utilizadas devido a sua versatilidade. Essa espécie bacteriana, anteriormente conhecido como *Pseudomonas cepacia*, e uma bactéria gram-negativa produtoras de lipases com características de alta estabilidade e atividade que catalisa uma ampla gama de diferentes reações em água e solventes orgânicos sob condições brandas (TRODLER *et al.*, 2009). A Figura 2 representa a conformação da LBC com a tampa da estrutura cristalina aberta e Fechada, sua tríade catalítica e a presença da esfera de cálcio. Apresenta características que a diferencia das demais, a exemplo de um sítio de cálcio, que supostamente, oferece estabilidade a tríade catalítica, além da presença de um ácido carboxílico adicional, que pode ser uma alternativa para a aceitação de prótons (KIM *et al.*, 2006).

### 1- Hidrólise

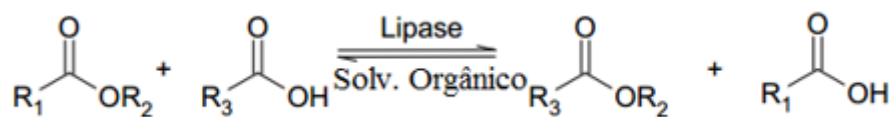


### 2- Esterificação

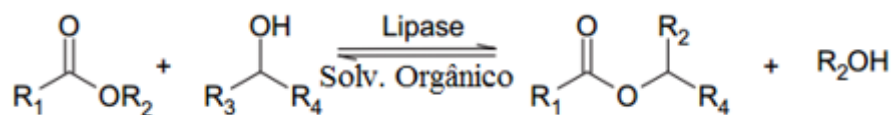


### 3- Transesterificações

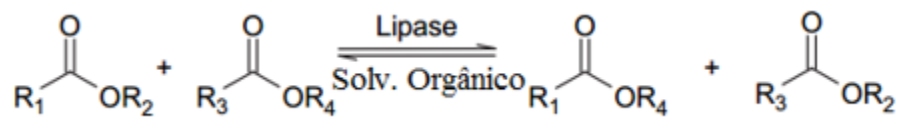
#### (a) Acidólise



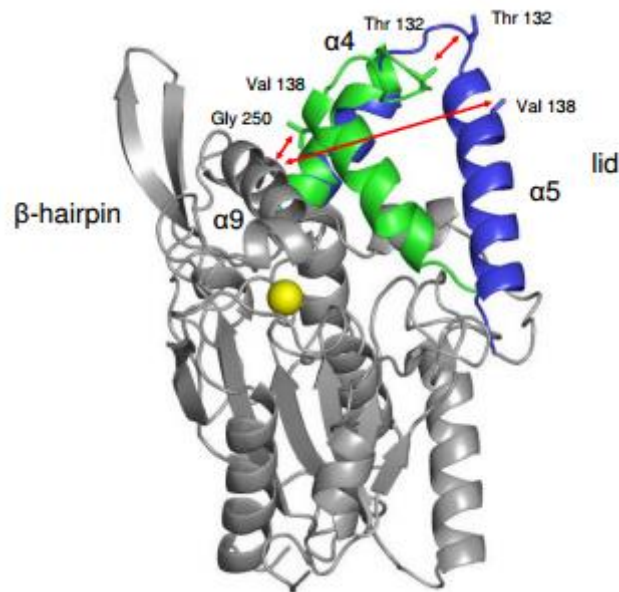
#### (b) Alcoólise



### 4- Interesterificação



**Figura 1:** Reações catalisadas por lipases (GHANEM, 2007).



**Figura 2:** Estrutura da Lipase de *Burkholderia cepacia*. A tampa da estrutura cristalina aberta está representada na cor azul e modelo fechado na cor verde, a esfera do íon  $\text{Ca}^{2+}$  é de cor amarela. A tríade catalítica que consiste em Ser, His e Asp é de cor vermelha. Fonte: TRODLER *et al.*, 2009.

### 3.3 Imobilização de enzimas

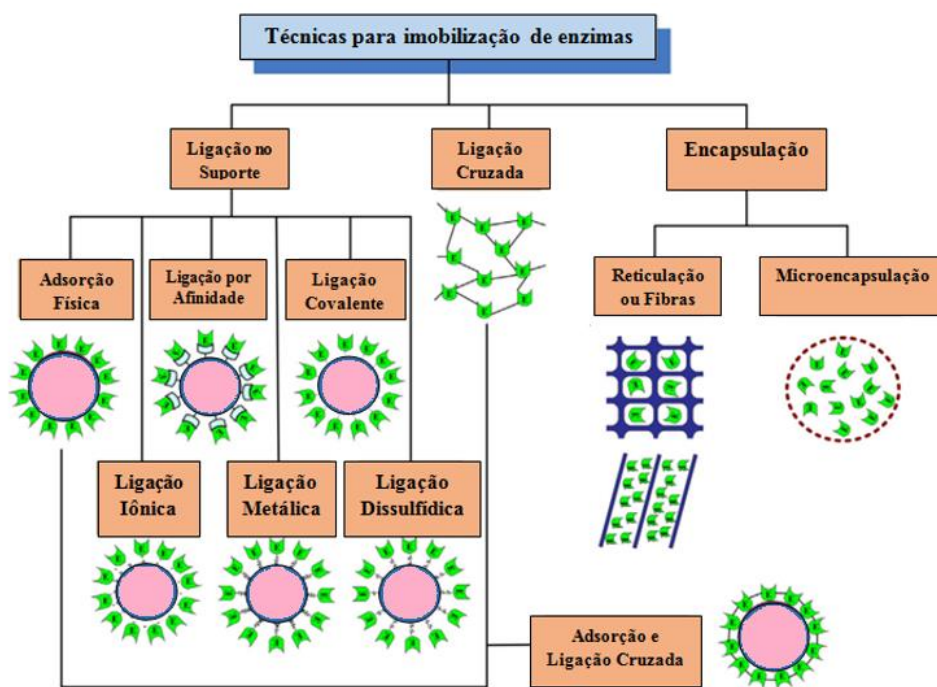
A imobilização pode ser definida como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador, entretanto, o conceito mais aceito para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência de engenharia Enzimática, realizada em 1971, que define como “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente (KENNEDY e CABRAL, 1987). Neste sentido, pesquisas foram intensificadas nos últimos vinte anos com a finalidade de desenvolver métodos mais eficientes de imobilização.

Algumas vantagens podem ser observadas com a utilização de enzimas imobilizadas, tais como: diminuir o custo do processo, aumentar a rapidez e a repetibilidade do processo, facilitar a recuperação dos produtos, melhorar o controle de operação de processos em reatores, minimizar a produção de efluentes e promover a redução do volume da reação, pois a enzima imobilizada em suportes inertes ao meio apresenta menor volume do que enzimas solúveis (AGUIAR *et al.*, 2013).

Entretanto, foram também relatadas algumas desvantagens com relação aos procedimentos de imobilização, como perda de atividade ou inibição enzimática, limitações difusionais e em algumas vezes, podendo promover custos adicionais na produção de um biocatalisador em virtude de processos demorados e trabalhosos (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Existem diversos métodos desenvolvidos e aplicados à imobilização de biocatalisadores, porém não há um método universal para todas as enzimas. No uso da estratégia de imobilização torna-se necessário levar em consideração parâmetros que estão relacionados ao tipo do suporte, a concentração de enzimas e de grupos reativos no suporte, o pH, a temperatura, o tempo de reação, às condições de imobilização, à simplicidade e custo do procedimento de imobilização, à nocividade dos reagentes às enzimas, de modo que, ao final, o processo de imobilização resulte em um biocatalisador imobilizado com boa retenção da atividade biológica e elevada estabilidade operacional (VILLENEUVE *et al.*, 2000; MENDES *et al.*, 2011).

Existe uma grande variedade de métodos para a imobilização de enzimas podendo ser físicos ou químicos e estes podem ser classificados como ligação no suporte, ligação cruzada e encapsulação, apresentados na Figura 3 (ZHAO *et al.*, 2015). Dentre esses métodos de imobilização, a adsorção física e ligação covalente são descritos na literatura com maior frequência.

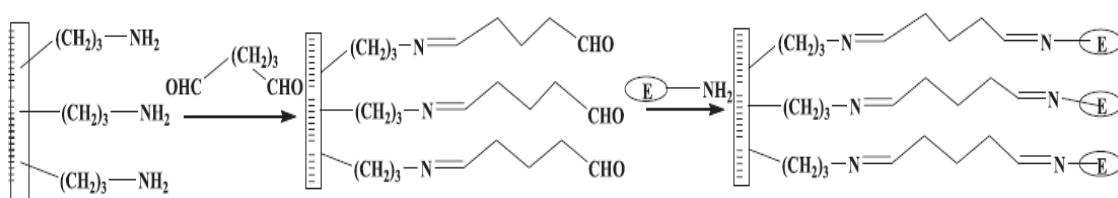


**Figura 3:** Diversas técnicas para a imobilização de enzimas. Fonte: (Adaptado de ZHAO *et al.*, 2015).

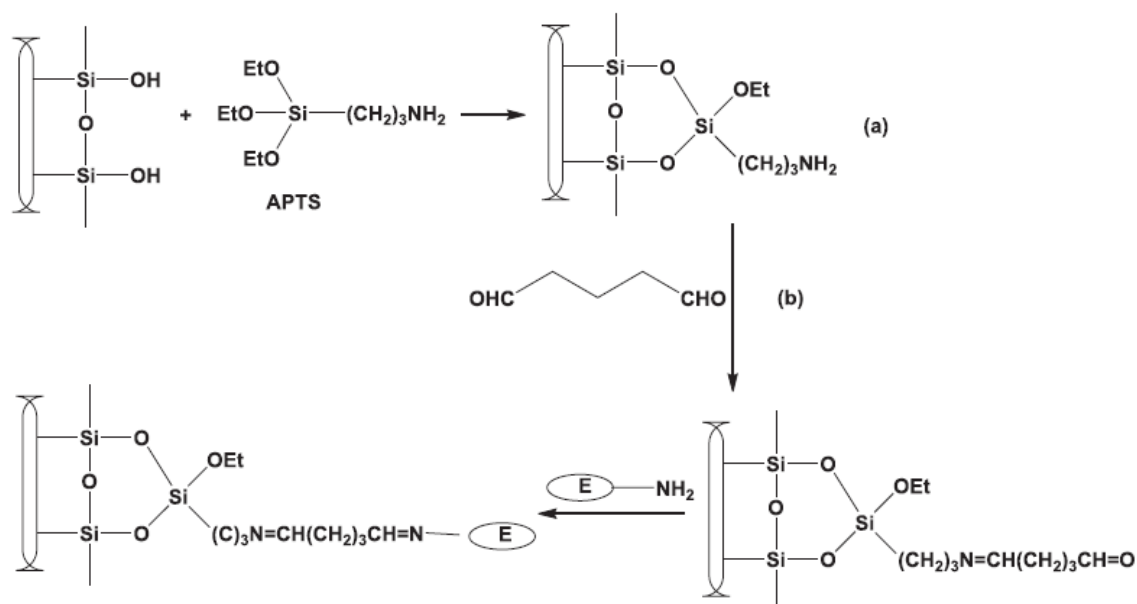


### 3.3.2 Imobilização por ligação covalente

A imobilização por ligação covalente é um dos métodos mais utilizados na literatura. Envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima [(NH<sub>2</sub>) da lisina e arginina, o CO<sub>2</sub>H do ácido aspártico ou glutâmico, o (OH) da serina ou tionina e o grupo (SH) da cisteína]. Esse método de imobilização geralmente é iniciado com uma etapa de ativação. Essa ativação pode ser realizada pelo método de silanização, onde os grupos funcionais do suporte são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído, indicado na Figura 5. Esse mecanismo apresenta a introdução de um grupo carbonila doados pelo agente silanizante, promovendo reações com os grupos nucleofílicos da enzima (BAILEY e OLLIS, 1986; BICKERSTAFF, 1997; MONIER *et al.*, 2009).

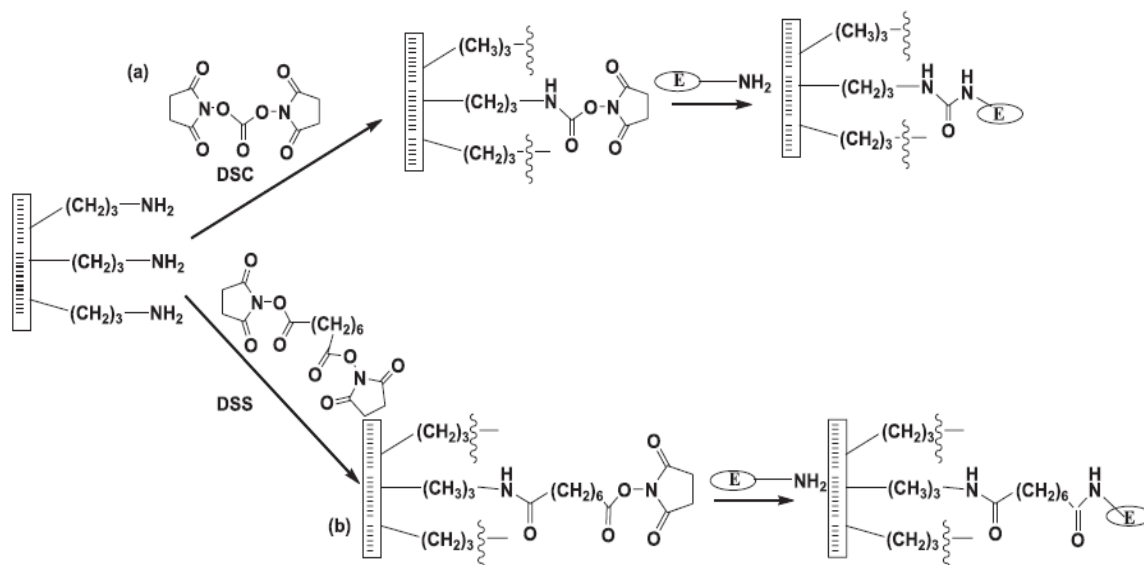


**Figura 4:** Reação de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando o glutaraldeído como agente de ativação. Fonte: CARDOSO *et al.*, 2009.



**Figura 5:** Imobilização por ligação covalente: (a) silanização, (b) adição do reagente espaçador, reação com glutaraldeído. Fonte: CARDOSO *et al.*, 2009.

O mecanismo apresentado na Figura 6 mostra um agente silanizante, a exemplo uma solução de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), que reage com os grupos hidroxilas ou silanóis do suporte formando grupos aminopropila disponíveis para a imobilização da enzima (MONIER *et al.*, 2009).

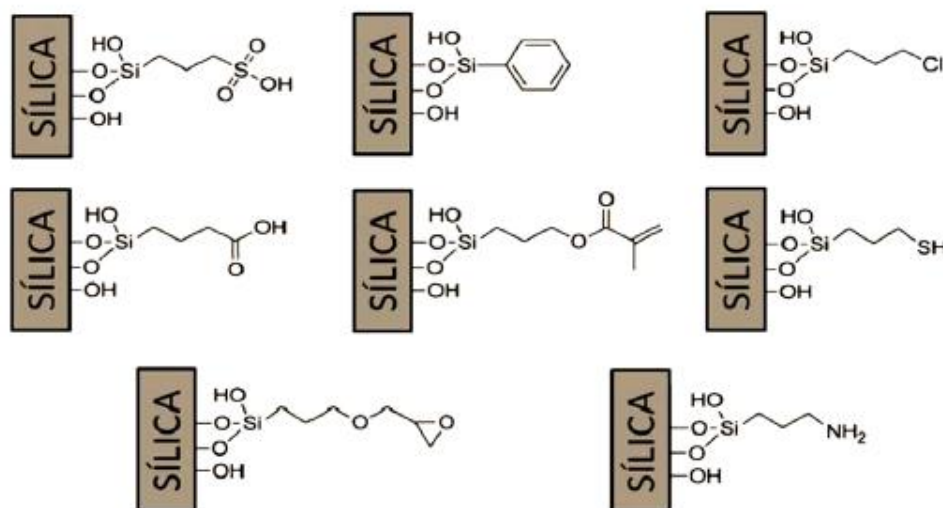


**Figura 6:** Reações de suportes aminopropilados para imobilização por ligação covalente, usando como agentes ativadores (a) o carbonato de N-N'-disuccinimidil (DSC) e (b) o suberato de N-N'-disuccinimidila (DSS). Fonte: CARDOSO *et al.*, 2009.

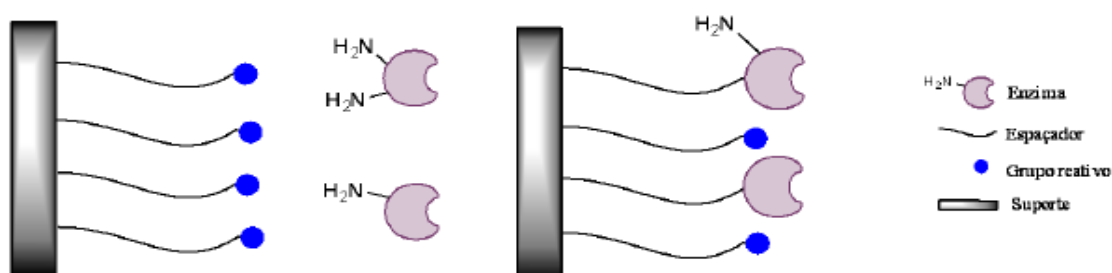
O esquema ilustra a eliminação dos grupos imino presentes em suportes aminopropilados através do carbonato de N-N'-disuccinimidila (DSC) (Figura 7a) ou do suberato de N-N'-disuccinimidila (DSS) (Figura 7b) como agentes ativadores ou, ainda, pela introdução de cadeias carbônicas longas entre o suporte aminopropilado e a enzima a fim de aumentar a hidrofobicidade. A reação é favorecida pela introdução do grupo carboxila à superfície do suporte afim de promover reações com os grupos nucleofílicos da enzima, devido a sua elevada suscetibilidade em reagir com esses grupos (MONIER *et al.*, 2009).

Hartmann e Kostrov (2013) verificaram ampla gama de grupos funcionais que também podem ser adicionados após modificação na superfície da sílica para imobilização de lipase. Dentre esses agentes bifuncionais, os mais utilizados são 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltriétoxissilano e 3-cloropropiltrimetoxissilano, epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodi-imida, etilenodiamina, glicidol, carbonildiimidazol, conforme mostrados na

Figura 8. A Figura 10 descreve o esquema da ligação covalente da enzima a superfície de um suporte após ser quimicamente ativados.



**Figura 7:** Ativação de suporte de sílica com diferentes grupos bifuncionais. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2014.



**Figura 8:** Representação esquemática do ataque covalente de lipase em um suporte quimicamente ativado contendo um espaçador. Um grupo amina da enzima pode atacar um grupo reativo no suporte ativado.

Existem diversas vantagens na imobilização por ligação covalente. Dentre elas foram observadas a sua maior eficiência e estabilidade e suas ligações devido a maior resistência ao pH, força iônica, solventes e temperatura. Além disso, evita o fenômeno de dessorção, a diminuição da velocidade de desativação espontânea, além de aumentar o tempo de vida útil e da estabilidade térmica do biorreator. As ligações covalentes também promovem rigidez na estrutura da enzima, limitando seu movimento quando submetida a altas temperaturas. No entanto, apresenta como desvantagem, fatores que podem levar a

perda da atividade enzimática. Dentre os fatores que contribuem para essa perda de atividade são: limitações na difusão, que podem reduzir a conversão e o impedimento estérico, bloqueando parcialmente a ligação com seus sítios ativos e mudanças estruturais, que na maioria das vezes ocorre durante o período do processo de imobilização (ZHU *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2014).

A escolha do suporte pode ser determinada levando em consideração diversas características dentre elas a sua natureza hidrofílica/hidrofóbica. A afinidade do suporte pela água pode influenciar a atividade catalítica da enzima imobilizada. Em geral, materiais hidrofóbicos são mais adequados como suporte para a imobilização da lipase. A quantidade de enzima adsorvida nesse tipo de suporte é maior e atividades mais altas são obtidas. Suportes hidrofílicos podem competir com a enzima pela água disponível na reação. Se a lipase e o suporte forem hidratados, os suportes hidrofílicos aumentam a concentração de água no ambiente da enzima favorecendo reações hidrolíticas (MATEO *et al.*, 2007; VILLENEUVE *et al.*, 2000; RESLOW *et al.*, 1988).

**Tabela 4:** Imobilização de lipase de diferentes fontes por diferentes métodos.

Método de imobilização	Fonte de lipase	Referência
Adsorção	<i>Candida rugosa</i>	GARCIA <i>et al.</i> , 1992
Adsorção	<i>Candida rugosa</i>	MONTERO <i>et al.</i> , 1993
Adsorção	<i>Aspegillus niger</i>	MALCATA <i>et al.</i> , 1992
L. Covalente	<i>Candida rugosa</i>	YANG <i>et al.</i> , 1997
L. Covalente	<i>Candida rugosa</i>	ARROYO <i>et al.</i> , 1999
L. Covalente e adsorção	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FERNANDEZ-LORENTE <i>et al.</i> , 2007
Adsorção e L. Covalente	<i>Mucor miehei</i>	MANJON <i>et al.</i> , 1991
Adsorção	<i>Bacillus sp.</i> ITP-001	CABRERA-PADILLA <i>et al.</i> , 2014
Adsorção	<i>Candida rugosa</i>	CABRERA-PADILLA <i>et al.</i> , 2011
L. Covalente	<i>Candida antarctica</i>	BOROS <i>et al.</i> , 2013

Segundo MALCATA *et al.* (1990), o uso de suportes hidrofílicos para a imobilização de lipases é geralmente caracterizado por grandes perdas de atividade após a imobilização. Essas perdas podem ser atribuídas a mudanças na conformação da lipase após a sua imobilização de tal forma que diminua a sua atividade. Isso pode ser atribuído

a pequenas quantidades de enzima que foram imobilizadas, diminuição da capacidade do substrato hidrofóbico atingir o sítio ativo da lipase e impedimento estérico provocado pela matriz carreadora limitando a flexibilidade da molécula da lipase. Conforme descrito na literatura, lipases de diversas origens em diferentes suportes foram utilizados por métodos variados de imobilização, mostrados na tabela 4.

### **3.4 Suportes Híbridos**

As tecnologias atuais cada vez mais requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais (orgânicos e inorgânicos) utilizados separadamente, essa combinação sintetiza materiais denominados de híbridos. Os híbridos constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações e são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos (JOSE *et al.*, 2005). Conforme a classificação dos suportes quanto à composição (Tabela 5), os materiais podem ser orgânicos e/ou inorgânicos, os quais a depender de sua origem podem ser naturais ou sintéticos. Os suportes sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas, podendo ser combinadas para formar um suporte ideal. Os naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, como baixo custo e facilidade de degradação, sem causar danos ao meio ambiente (MENDES *et al.*, 2013).

O uso de suportes multifuncionais pode abrir grandes possibilidades de aplicações, pois apresentam uma alta versatilidade e a utilização desses diferentes suportes podem facilitar a modulação das propriedades de lipases, por exemplo (BARBOSA *et al.*, 2012). Diversos compostos orgânicos já foram empregados na produção de suporte híbridos, porém devido ao seu baixo custo, baixa toxicidade, biocompatibilidade e propriedades multifuncionais, os biopolímeros e resíduos de biomassa industriais ainda se mostram promissores (SIMÕES *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2009).

A produção de matrizes híbridas já foram amplamente empregadas na presença de precursores silanos, tais como tetraetilortossilicato (TEOS) e tetrametilortossilicato (TMOS) devido a biocompatibilidade destes precursores com diversos polímeros, tais como álcool polivinil (PVA), celulose, carragenana, quitosana, entre outros (SIMÕES *et al.*, 2011). Apesar de vários suportes híbridos se mostrarem promissores e precisarem de estudos mais aprofundados para sua otimização, definir um suporte ótimo é difícil (CUNHA *et al.*, 2014). A principal razão para isto é que a síntese de suporte existe uma

diversidade de processos e por isso cada um ocupa uma posição bastante diferente quando considerado sua aplicação (CUNHA *et al.*, 2014).

**Tabela 5:** Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas e proteínas.

Natureza	Classificação	Suporte	Enzima ou proteína	Referência
Natural	Orgânico	Sabugo de milho	<i>Burkholderia cepacia</i>	RUZENE <i>et al.</i> , 2014
		Bagaço da cana-de-açúcar	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	MENDES <i>et al.</i> , 2013
		Fibra de coco	<i>Candida antarica B</i>	BRÍGIDA <i>et al.</i> , 2008
	Inorgânico	Sílica	<i>Rhizopus oryzae</i>	ASHJARI <i>et al.</i> , 2015
		Nanofibra	<i>Candida rugosa</i>	ZHU & SUN, 2012
Sintético	Orgânico	Argila	Pâncreas suíno	SCHERER <i>et al.</i> , 2012
		Poliestireno	Pâncreas suíno	HOU <i>et al.</i> , 2014
		PHBV	<i>Bacillus sp.</i> ITP-001	CABRERA-PADILLA <i>et al.</i> , 2013
	Inorgânico	Poliuretano	<i>Rhizopus oryzae</i>	GROSSO <i>et al.</i> , 2013
		Nanopartículas de Sílica	<i>Rhizopus oryzae</i>	ASHJARI <i>et al.</i> , 2015
		Sílica	<i>Bacillus sp.</i> ITP-001	CARVALHO <i>et al.</i> , 2013
		Alumina	<i>Bacillus sp.</i>	KUMAR <i>et al.</i> , 2013
Natural/Sintético	Híbrido (Orgânico + Inorgânico)	Ferro – Quitosana	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	WANG <i>et al.</i> , 2015
		Octil – sílica – Metacrilato	<i>Candida antarctica</i>	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2013
		Sílica – Quitosana	<i>Candida rugosa</i>	SIMÕES <i>et al.</i> , 2011
		Policaprolactona – Sílica	FITC-BSA/ ADH/ SOD	FAN <i>et al.</i> , 2016
		Polidopamina magnética – Alginato	<i>Candida rugosa</i>	HOU <i>et al.</i> , 2015

PHBV = Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

FITC-BSA = Fluoresceína isotiocianato-albumina de soro bovino

ADH = Álcool desidrogenase

SOD = Superóxido dismutase

Independentemente da estratégia utilizada para preparar uma matriz híbrida, o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado (JOSE *et al.*, 2005). O processo sol-gel implica na mudança de um sistema a partir de um líquido (sol), que é uma dispersão de partículas coloidais, com dimensão entre 1 e 100 nm, estável em um fluido, em uma fase sólida “gel”, formada pela estrutura rígida das partículas coloidais, ou de cadeias poliméricas. A reação de polimerização sol-gel pode ser dividida em duas etapas básicas: na primeira, a hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do tipo silanol; e na segunda, a condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente à formação do sol e, eventualmente, ao gel. Os materiais híbridos orgânico-inorgânicos a base de sílica obtidos via sol-gel a partir da adição de um componente orgânico no meio de reação, aumenta a complexidade do processo, porém essa síntese ainda pode ser bem controlada, uma vez que o precursor inorgânico apresenta uma cinética lenta nas reações de gelificação (BENVENUTTI *et al.*, 2009).

A sílica é um composto inorgânico, com diversas propriedades tais como alta resistência química, dureza, porosidade, e susceptibilidade a modificação torná-lo atraente para muitas aplicações. Sílica pode ser combinada com sucesso com muitos compostos orgânicos ou inorgânicos que pode dotá-lo com novas propriedades físico-químicas e estender a gama das suas aplicações. A literatura contém um número de exemplos de sucesso de combinações de sílica com outros óxidos inorgânicos, íons metálicos, ou polímeros. Recentemente, muito interesse tem sido mostrado na possibilidade de obtenção de biomateriais multifuncionais de sílica combinada com polímeros naturais (NOWACKA *et al.*, 2013).

Dentre os suportes, os polímeros naturais e sintéticos pertencem a uma classe muito importante para aplicação da técnica de imobilização de enzimas (MATEO *et al.*, 2007). Um exemplo de polímeros naturais, e o poli (3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (PHBV) o qual leva algumas vantagens em relação aos sintéticos, pois apresentam de forma geral baixo custo é biodegradável, portanto não causa nenhum dano ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). A utilização de xerogel de sílica utilizando compostos orgânicos como um aditivo para a produção de suportes híbridos já foi relatado (QU *et al.*, 2010), mas de acordo com as pesquisas realizadas até hoje, a utilização de PHBV como composto orgânico e sílica para a produção de compósitos híbridos com o processo sol-gel não foi estudado para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.

O potencial de aplicação do PHBV na agroindústria na área médica foi recentemente estudado, e no caso do uso deste suporte para a imobilização de enzimas

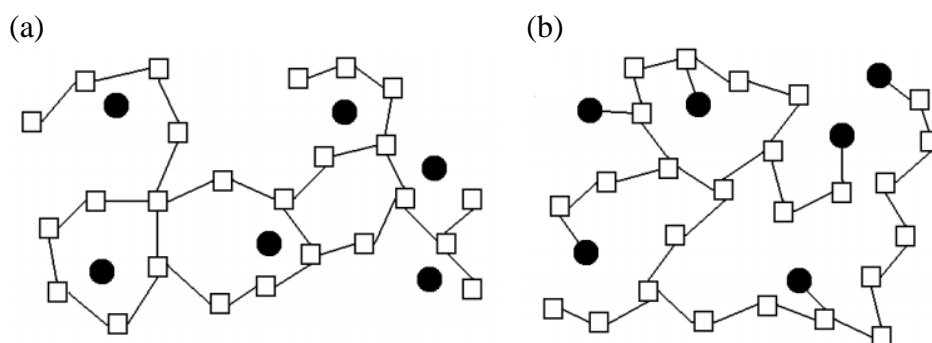
para a aplicação na biocatálise o único estudo descrito na literatura foi realizado por este grupo. Neste artigo, a lipase obtida por outra fonte microbiana, a *Cândida rugosa* (LCR), foi imobilizada em PHBV e obteve um rendimento de imobilização de 30% e uma boa estabilidade térmica e operacional (CABRERA-PADILLA *et al.*, 2011). Conseqüentemente, o PHBV tornou-se uma boa alternativa para ser utilizada como suporte para imobilização de enzimas, devido a biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil adsorção, propriedades não tóxicas e além disso, é considerado ecologicamente correto.

O processo sol-gel é dependente de diversas variáveis, dentre elas: tempo e temperatura da reação, concentração de reagentes, natureza do catalisador, entre outros. E estas variáveis são responsáveis por determinar as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto (SIMÕES *et al.*, 2011). FAN *et al.* (2016) estudaram uma nova estratégia que resulta na formação de estruturas significativamente mais porosas por um efeito de sinergia entre o processo de síntese pelo método sol-gel e extração com solvente em micro-gotas, que não só gera componente funcional inorgânico homogêneo, nesse caso a sílica, em microesferas, como também evita a adição de qualquer modelo ou molde. Na produção de suportes híbridos a base de sílica, o valor do pH aplicado interfere nas diferenças da estrutura de poros do suporte (QU *et al.*, 2010). Segundo BENVENUTTI *et al.* (2009), existem dois tipos de procedimentos que podem ser utilizados na síntese de suportes híbridos a base de sílica (Figura 10): o primeiro acontece com a adição de compostos orgânicos não polimerizáveis com os grupos do silício, mas é adsorvido na rede reticulada através de forças fracas como ligações de van der Waals ou ligações de hidrogênio (Figura 10a). O segundo é realizado com organossilanos polimerizáveis que apresentam grupos que se ligam diretamente aos grupos do silício através de ligações químicas mais fortes, permitindo assim uma maior estabilidade térmica do composto orgânico quando comparado ao primeiro (Figura 10b). Ainda para o aprimoramento desses suportes, os aditivos químicos podem ser usados no processo e assim obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico (SIMÕES *et al.*, 2011).

O uso de suportes hidrofóbicos, dentre os diferentes protocolos utilizados para a imobilização de lipases, é o mais eficiente. Essa eficiência acontece porque o mecanismo de ativação interfacial da enzima com o suporte hidrofóbico permite sua imobilização de



forma aberta, facilitando o acesso do substrato ao seu sítio ativo (CUNHA *et al.*, 2014). Além disso, podem acontecer formação de dímeros com características catalíticas diferenciadas, pois a forma aberta de uma molécula de lipase pode estabilizar a forma aberta de outras lipases e ainda torná-las estáveis o suficiente para durante a imobilização adsorver seletivamente as outras lipases (MANUEL *et al.*, 2015). Mendes *et al.* (2013)



**Figura 9:** Representação dos tipos de suporte híbridos. Fonte: BENVENUTTI *et al.*, 2009.

verificaram que o uso de suportes híbridos de quitosana-alginato para a imobilização de *Thermomyces lanuginosus* obtiveram 68% de recuperação de atividade e aumentou sua estabilidade operacional de 1,25 para 3,99 h quando comparado nesse mesmo estudo com o suporte orgânico do bagaço de cana. Contudo as informações são escassas na literatura quanto a suportes orgânicos, e principalmente os híbridos para a imobilização de enzimas, evidenciando ainda a necessidade de estudos destes sistemas imobilizados visando à viabilidade de aplicação em diversas reações de biotransformação em escala industrial. Uma das alternativas para a obtenção de biocatalisadores mais eficientes é o uso de líquidos iônicos como aditivos na imobilização ou na preparação dos suportes.

### 3.5 Aditivos utilizados nos processos de imobilização

O uso de aditivos na produção de suportes tem como a principal função a formação de uma matriz altamente ordenada que possa aumentar a estabilidade e atividade da enzima, além de protegê-la da inativação por efeitos diversos durante o processo de imobilização e aumentar a sua eficiência catalítica (SOARES *et al.*, 2006; HARA *et al.*, 2010). Para atingir este propósito, diferentes tipos de agentes estabilizantes possuem a função de proteger a enzima de efeitos de agregação ou desnaturação, além de considerar

outros efeitos estabilizantes de alguns tipos de aditivo, tais como: retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e efeitos dispersantes das moléculas da enzima, facilitadores de transporte de massa, aumento dos poros da sílica e ainda pode ele estar presente ou ausente no meio de dispersão (GONÇALVES *et al.*, 1999; REETZ *et al.*, 1996; SOARES *et al.*, 2006; HARA *et al.*, 2010).

Estudos de vários aditivos, tais como polivinil álcool (PVA), polietileno glicol (PEG), albumina, Aliquat® 336, ciclodextrina, líquidos iônicos (LI) e entre outros, foram sugeridos como agentes que podem estabilizar as enzimas (Tabela 6), protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima e/ou causando alterações conformacionais que conduz à ativação da enzima (SOARES *et al.*, 2003; MAURY *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005; ORÇAIRE *et al.*, 2006; NASSREDDINE *et al.*, 2008, SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013).

Os líquidos iônicos (LIs) que são sais orgânicos compostos somente por íons (cátions orgânicos volumosos e ânions de diferentes tamanhos), os quais apresentam pressão de vapor baixa, líquidos à temperatura ambiente, excelente estabilidade química e térmica, além de apresentar excelente capacidade para diversos tipos de materiais, estão sendo utilizados para diferentes aplicações (RIOS *et al.*, 2012; MATTEDI *et al.*, 2011; YUE *et al.*, 2011; ASLANOV, 2011). Segundo ASLANOV (2011), os líquidos iônicos por apresentarem essas características podem ser utilizados em diversas aplicações como: síntese química, tecnologias de separação, preparação de nanomateriais, a catálise homogênea, modelos para produção de sólidos porosos, óleos, graxas e fluidos hidráulicos. Além disso, são descritos como bons aditivos em processos de imobilização de enzimas.

Os LIs podem ser ajustados de acordo com a necessidade o qual ele será aplicado, otimizando-o. Esses ajustes acontecem devido a possibilidade de variação na estrutura iônica dos líquidos iônicos, algumas propriedades como viscosidade, densidade, solubilidade e ponto de fusão que permite assim o desenvolvimento de produtos e processos mais eficientes (ALVAREZ *et al.*, 2011; MATTEDI *et al.*, 2011). Os LIs quando comparados com os solventes orgânicos convencionais são considerados uma alternativa ambientalmente mais correta, devido a excelentes propriedades, em vista do desenvolvimento sustentável, o que atrai bastante atenção de diversos pesquisadores (ASLANOV, 2011) (Tabela 7).

Segundo ZARCULA *et al.* (2010), a versatilidade estrutural dos líquidos iônicos é de suma importância, podendo sintetizar um número ilimitado de compostos, visto que

suas propriedades são determinadas pela estrutura e interação entre os íons. e a grande assimetria de tamanho entre o cátion e ânion e o número de combinações que lhes conferem propriedades únicas que podem ser sintetizados especificamente para um determinado fim. Espera-se, que num futuro próximo, novas classes de líquidos iônicos com propriedades eletroquímicas ainda melhores que as dos sistemas atuais estarão disponíveis.

**Tabela 6:** Utilização de aditivos na síntese de biocatalisadores imobilizados em matrizes hidrofóbicas de sílica aplicados em diversas reações.

<b>Lipase</b>	<b>Aditivo</b>	<b>Tipo de reação</b>	<b>Referência</b>
<i>Burkholderia cepacia</i>	Líquidos iônicos	Hidrólise	BARBOSA <i>et al.</i> (2014)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Líquidos iônicos	Transesterificação	SOUZA <i>et al.</i> (2013)
<i>Candida antartica</i>	Líquidos iônicos	Acilação	RIOS <i>et al.</i> (2012)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Aliquat® 336	Hidrólise	SOUZA <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Líquido iônico	Acilação de álcoois secundários recêmicos	ZARCULA <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida antartica</i>	PVA	Transesterificação	NASSREDDINE <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida rugosa</i>	PVA PEG	Esterificação	SOARES <i>et al.</i> (2004)

Apesar dos benefícios oferecidos pelos LIs o seu uso ainda apresenta elevados custos de síntese, dificultando sua aplicação industrial (ZARCULA *et al.*, 2010). Para reduzir esse obstáculo oferecido na sua síntese, nas últimas décadas vêm sendo estudados uma nova classe de LIs, os líquidos iônicos próticos.

Os líquidos iônicos próticos (LIP) compreendem um subconjunto de LI que podem ser obtidos a partir de ácidos orgânicos, inorgânicos e aminas, como pode ser observado na Figura 11 alguns exemplos e estes apresentam baixo custo, simplicidade de síntese e diferentes aplicações o que favorece o interesse industrial (ÁLVAREZ *et al.*, 2010).

**Tabela 7:** Tipos de líquidos iônicos utilizados em diversos trabalhos envolvendo agentes biológicos.

Agente biológico	LI	Tipo de LI	Referência
Diversas bactérias e fungos	m-2-HEAA m-2-HEAPr m-2-HEAB m-2-HEAP	Prótico	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2016)
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	C <sub>5</sub>	Prótico	BARBOSA <i>et al.</i> (2014)
Lipase de <i>Bacillus</i> sp. (ITP 001)	Base de Piridínio e Imidazólio	Aprótico	CABRERA-PADILLA <i>et al.</i> , 2014
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	C <sub>5</sub>	Prótico	SOUZA <i>et al.</i> (2013)
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Base de Trialquilamônio	Aprótico	RIOS <i>et al.</i> (2012)
Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Base de Imidazólios	Aprótico	ZARCULA <i>et al.</i> (2010)
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Base de Imidazólios	Aprótico	LEE <i>et al.</i> (2007)
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	Base de Imidazólios	Aprótico	HARA <i>et al.</i> (2007)

C<sub>5</sub> = Pentanoato de N-metilmonoetanolamina

m-2-HEAA = Acetato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio

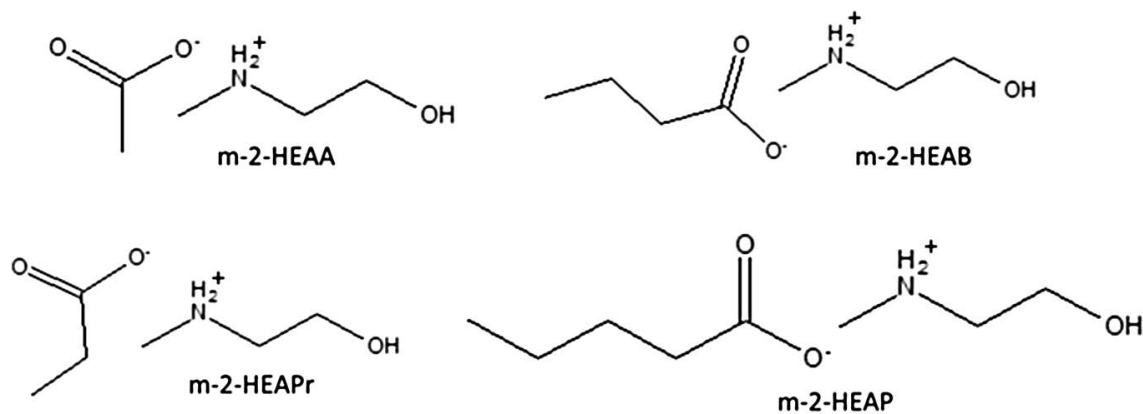
m-2-HEAPr = Propanoato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio

m-2-HEAB = Butirato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio

m-2-HEAP = Pentanoato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio

Os líquidos iônicos próticos se diferenciam dos líquidos iônicos apróticos (Figura 12) pela presença de pelo menos um próton, com a possibilidade de promover ligações de hidrogênio (RIOS *et al.*, 2012). A maioria dos estudos realizados relatam a utilização de LIs áproticos constituídos principalmente dos cátions orgânicos a base do imidazólio, piridino, tetraalquilamônio e tetraalquilfosfônio (ÁLVAREZ *et al.*, 2010). Segundo Zarcula (2010), a adição de LIs a base imidazólio no processo de imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* em matrizes híbridas sol-gel, resultou em biocatalisadores imobilizados com rendimento de recuperação total de atividade geralmente superior a 100%, constatando influência positiva do uso do aditivo. Um estudo recentemente avaliou diferentes líquidos iônicos, e apresentou um melhor rendimento de imobilização com

60% de recuperação de atividade em lipase *Bacillus* sp. (ITP-001) imobilizada em PHBV pelo método de adsorção física com o líquido iônico aprótico 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida [C<sub>4</sub>min] Tf<sub>2</sub>N (CABRERA-PADILLA *et al.*, 2014).

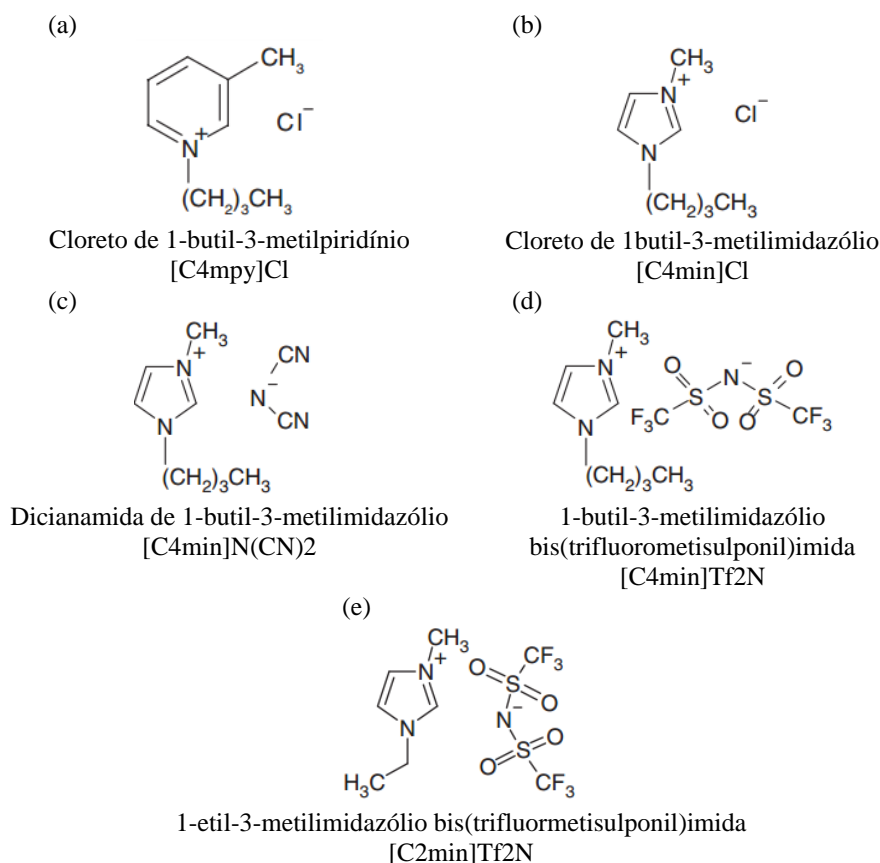


**Figura 10:** Estruturas químicas e respectivas abreviaturas de alguns líquidos iônicos próticos. Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2016.

Os líquidos iônicos próticos possuem algumas características desvantajosas quando comparados aos líquidos iônicos apróticos, como por exemplo uma estabilidade e condutividade mais baixa, o que diminui o seu interesse para diversas aplicações. Mas em contrapartida, algumas características superam essas limitações para uma série de finalidades, dentre elas: baixa toxicidade, ótima biodegradabilidade, síntese e métodos de purificação simples, e o principal, baixo custo, favorecendo o interesse industrial (ÁLVAREZ *et al.*, 2010; MATTEDI *et al.*, 2011). Trabalhos realizados pelo nosso grupo recentemente tem confirmado tal efeito positivo dos líquidos iônicos próticos na imobilização de enzimas para aplicações de biotransformação apresentando um melhoramento considerável na atividade e estabilidade das enzimas, quando o procedimento de imobilização é realizado em sua presença (BARBOSA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2013).

Segundo estudo desenvolvido por SOUZA (2013), o uso de diferentes líquidos iônicos próticos para a imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica sol-gel aponta que a maior recuperação de atividade foi observada na amostra contendo o líquido iônico com o perfil mais hidrofóbico, Pentanoato de N-metilmonoetanolamina (C<sub>5</sub>), utilizado durante o processo de imobilização. Os resultados apresentaram este efeito positivo, demonstraram os excelentes valores na recuperação da atividade, representando um aumento de 35 vezes em comparação com a amostra controle sintetizada na ausência

do mesmo. Outro trabalho que utilizou também o C<sub>5</sub> como aditivo para a imobilização também da lipase de *Burkholderia cepacia* em sílica aerogel aumentou 2 vezes o tempo de meia-vida do biocatalisador de 6 h na ausência do LIP para quase 12 h (BARBOSA et al., 2014).



**Figura 11:** Estruturas químicas e nomenclaturas e abreviaturas de alguns líquidos iônicos apróticos. Fonte: CABRERA-PADILLA *et al.*, 2014.

O interesse industrial de biocatalisadores imobilizados é cada vez mais alto, visto os avanços das técnicas de imobilização que propiciam biocatalisadores mais eficientes e possíveis de catalisar diversas reações como a transesterificação e esterificação.

## Capítulo 4

A dissertação neste tópico será apresentado na forma de artigo científico o qual corresponde aos resultados referentes aos estudos da influência dos diferentes líquidos iônicos práticos testados na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em suporte híbrido. O artigo foi organizado de acordo com as normas do periódico Journal Chemical Technology and Biotechnology.

## 4. ARTIGO

### **Protic ionic liquids influence on immobilization of Lipase *Burkholderia cepacia* on hybrid supports**

Sílvia R. S. Martins<sup>a</sup>, Amanda dos Santos<sup>a</sup>, Aline, T. Fricks, Álvaro S. Lima<sup>a,b</sup>, Silvana Mattedi<sup>c</sup>, Daniel P. Silva<sup>d</sup>, Cleide M. F. Soares<sup>a,b</sup>, Rebeca Y. Cabrera-Padilla<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju SE, Brazil.

<sup>b</sup>Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas 300 - Prédio do ITP - Farolândia, 49032-490, Aracaju SE, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, 40210-630, Salvador BA, Brazil.

<sup>d</sup>Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, Jardim Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão SE, Brazil.

**Key words:** Lipase, Immobilization, Covalent binding, hybrid support, Protic ionic liquids.

Correspondent author adress:

Rebeca Y. Cabrera-Padilla  
Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP/UNIT  
Universidade Tiradentes, Campus Farolândia  
Av. Murilo Dantas, 300 Bairro Farolândia  
49032-490, Aracaju, Sergipe, Brazil  
Tel.: 55 79 32182190  
Fax: 55 79 32182190  
e-mail: yndiracp@gmail.com



## ABSTRACT

**BACKGROUND:** This work aims to assess the use of protic ionic liquids (PIL), propanoate, butanoate and pentanoate of N- methylmonoethanolamine (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>), in the preparation of hybrid supports made of Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) and silica for immobilization of Lipase of *Burkholderia cepacia* (BCL) by covalent binding. For immobilized biocatalysts (IBs) it was determined the performance of immobilization and characterization (pH, temperature, stability thermal, operational and in solvents) being defined the best condition. For the supports and efficient IB was evaluated the morphological and physicochemical characterization (MEV, BET, FTIR and TGA).

**RESULTS:** For the preparation of the hybrid support, the experiment with 3 g of PHBV presented higher percentage of mass, around 50% of recovering of the support in the granulometry used. The IBs total activity recovery yield (Ya) in hybrid supports modified with ionic liquids IB-hybrid-C3 (103%), IB-hybrid-C4 (120%) and IB-hybrid-C5 (133%) were above the control (90%), being IB-hybrid-C5 the most efficient, which presented better thermal and operational stability.

**CONCLUSION:** The *Burkholderia cepacia* lipase was immobilized successfully in hybrid support (PHBV and silica) modified with protic ionic liquid by covalent binding, resulting in an improvement in their morphological and physico-chemical characteristics, and consequently with greater Ya and good thermal and operational stability.

**Key words:** Lipase, Immobilization, Covalent binding, Hybrid support, Protic Ionic Liquids.

## INTRODUCTION

A challenge for the chemical, pharmaceutical and food industries (among others) is the use of green processes in order to avoid or minimize the residue production and the use of toxic and/or dangerous materials.<sup>1</sup> One alternative for the reduction of these impacts is the use of enzymes free and immobilized as biocatalysts.<sup>2</sup> However, the use of enzymes on a large scale is limited, for its recovering can be difficult due to their solubility in water, making them relatively unstable.<sup>3</sup>

The advances in technology require new materials or improvement in the existent or traditional materials for their use as supports in the enzymes immobilization. An example of a new approach that leads to new materials is the synthesis of hybrid inorganic-organic material through the combination of polymers and silica.<sup>4,5</sup> These hybrids are promising alternatives in the produce of new multifunctional materials, with a wide range of applications.<sup>6</sup> There are different effective approaches to enhance enzymatic activity and stability of the biocatalysts using additives with goal render one convenient chemical modification of the support and suitable for specific catalytic applications. All these characteristics make be potential candidate to act as suitable supports for enzymes. One of those alternatives is the use of ionic liquids as additives modifier of the support for immobilization process of the lipases.<sup>7-11</sup> The ionic liquids (ILs) are classified as protic and aprotic and they are salts with low fusion point, usually under 100°C, turning them liquid at room temperature.<sup>12,13</sup> They are also considered green solvents for having specific properties such as low steam pressure, excellent solvation potential, non-inflamable and for having excellent chemical and thermal stability.<sup>14</sup> Cations and anions are used for obtaining the ILs, showing advantage with the combinations of these ions in order to modify their physicochemical properties (density, viscosity, fusion point, polarity, etc.) being able of influence positively the enzymatic stability, recovering and activity.<sup>12</sup> The protic ionic liquid comprise a sub-assembly of ILs that can be obtained from organic and inorganic acids and amines, and they are different from the aprotic ionic liquids (AIL) because of the presence of at least one proton, with the possibility of promoting hydrogen bindings.<sup>15</sup> Although they have some disadvantages compared to AIL (lower conductivity and stability), the LIP have qualities that overcome these limitations such as methods

of synthesis and purification simple, good biodegradability, low toxicity, and especially low cost, awakening largest industrial interest.<sup>16</sup> Several researches have confirmed that ionic liquids are suitable media for enzyme catalysis, however most found in the literature are using ionic liquids aprotic<sup>17,18,12,19,20,21</sup> and some ionic liquids protic.<sup>15,22,23,24</sup>

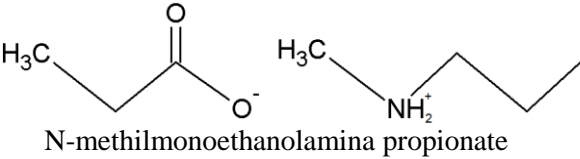
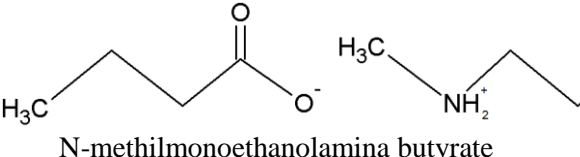
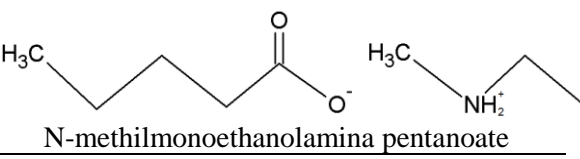
Thus, in order to obtain a more efficient immobilized biocatalyst, this article aims to verify the influence of PIL, propanoate, butanoate and pentanoate of N- methylmonoetanolamine (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>), in the preparation of hybrid support (PHBV and silica) to assess the immobilization and biochemical, physicochemical and morphologic properties of the modified supports and the Lipase of *Burkholderia cepacia* (BCL) immobilized by covalent binding.

## **MATERIALS E METHODS**

### **Materials**

The Lipase *Burkholderia cepacia* (BCL) purchased from Sigma Co, St. Louis, MO, EUA ( $\geq 30.000$  U/g, pH 7.0, 50°C). Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) used as immobilization support for the lipase and preparation of the support hybrid, was kindly supplied by PHB Industrial S.A. (Serrana, SP, Brazil). The precursor used in the preparation of the supports was the tetraethylortossilicate TEOS (C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Si) 98% pure purchased from Sigma Aldrich Co (Milwaukee, WI, EUA). The other reagents used were: Hexane 99% (Synth, Brasil); Commercial Ethanol, 99.5% (Synth, Brazil); Epichlorohydrin, Heptane 99% (Synth, Brazil); Ammonium Hydroxide 27% (Synth, Brazil), among others, besides of olive oil (purchased in the local market). Protic ionic liquids studied in this work were supplied by Research Group of Thermodynamics applied at the Federal University of Bahia, described in the Table 1.

Table 1: Structure of protic ionic liquid used in this work.

Abbreviat ion	Organic acid	Log P	Structure (nomenclature)
C <sub>3</sub>	Propionic acid	0.25	 N-methylmonoethanolamina propionate
C <sub>4</sub>	Butyric acid	0.78	 N-methylmonoethanolamina butyrate
C <sub>5</sub>	Pentanoic acid	1.31	 N-methylmonoethanolamina pentanoate

#### Support preparation (Silica and hybrid)

It was prepared 4 types of silica supports (silica-control, silica- C<sub>3</sub>, silica- C<sub>4</sub> and silica-C<sub>5</sub>) and 4 types of hybrid supports PHBV and silica (hybrid-control, hybrid-C<sub>3</sub>, hybrid-C<sub>4</sub> and hybrid-C<sub>5</sub>) based through sol-gel method according to the methodology described by Soares et al.<sup>25</sup> with modifications. The control was prepared without additives, the other three supports were prepared by adding ionic liquids 1% (m.v<sup>-1</sup>) (propanoate, butanoate and pentanoate of N-methylmonoethanolamine designated by, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>, respectively. The ethanolic solution was prepared by dissolving 36 mL of tetraethylortosilicate (TEOS) in 30 mL absolute ethanol (99%) in nitrogen inert atmosphere. The ethanolic solution was kept under stirring for about 5 min at room temperature. It was slowly added 0.11 mL of hydrochloric acid (36%) diluted in 5 mL of ultra pure water (pre hydrolyzing solution) to the solution, when the temperature was kept at 35°C under stirring, during 90 min. For the preparation of hybrid support modified was added 3g PHBV Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) after adding 1% (m.v<sup>-1</sup>) ionic liquid. Then added 0.5 mL ammonium hydroxide dissolved in 3 mL of ethanol (hydrolysis solution). The mixture was kept standing at a temperature of 35°C for 60 min and then kept under low temperature conditions for 24 hours to complete the polycondensation. After this period, the gel was removed and washed with hexane to eliminate waste, and then was kept in a desiccator for 72 h.

### **Lipase immobilization by covalent binding**

The *Burkholderia cepacia* lipase immobilization on the silica supports control and modified with ILP (silica-control, silica-C<sub>3</sub>, silica-C<sub>4</sub> and silica-C<sub>5</sub>), the PHVB supports control and modified with ILP (PHVB-control, PHVB-C<sub>3</sub>, PHVB-C<sub>4</sub> and PHVB-C<sub>5</sub>) and in the hybrids control and modified with PIL (hybrid-control, hybrid-C<sub>3</sub>, hybrid-C<sub>4</sub> and hybrid-C<sub>5</sub>) were performed as described Paula et al.<sup>26</sup> with some modifications. The support was activated with epichlorohydrin 2.5 % (v.v<sup>-1</sup>) in a potassium phosphate buffer (0.1M, pH 7.5) in the ratio of 1g of support to 10mL of solution. After the homogenization, the mixture was kept under stirring for 1 hour and then submitted to vacuum filtration. During the filtration the support was exhaustively washed with distilled water and phosphate buffer solution, then it was taken to the stove (60 °C) for 24 h in order to eliminate the humidity excess. The activated support was soaked in hexane in a ratio of 1:10 (solid:liquid) and kept under stirring for 2 hs. After activation, for PHVB was added 1% (m.v<sup>-1</sup>) of the ionic liquid support. Then, for each gram of support it was added 0.25 g of BCL and 100 µL of water solution containing 5 mg.mL<sup>-1</sup> of polyethylenoglycol (PEG-1500). The suspension containing enzyme, support and PEG-1500 was homogenized by soft stirring with glass rod followed by static contact for extra 18 h at 4°C. The biocatalyst recovery was made by vacuum filtration, followed by repeated washes with hexane and dried in the desiccator at room temperature for 24 h.

### **Total activity recovery yield**

After immobilization of lipase on the supports (PHVB, silica and hybrid) was verified the influence of protic ionic liquids from the comparison of total activity recovery yield (Y<sub>a</sub>).

The lipase hydrolytic activity in your free and immobilized form was determined by the method described by Soares et al.<sup>27</sup> with modifications. One unit of activity was defined as the quantity of enzyme that releases 1 µ mol of fatty acid per minute of hydrolyses reaction of olive oil, in the experiment conditions. Analyses of hydrolytic activities performed on the immobilized lipases were used to determine the total activity recovery yield, Y<sub>a</sub> (%), according to Eq. (1).

$$Y_a = \frac{U_s}{U_o} \times 100 \quad (1)$$

Where:  $U_o$  = units of activity offered for immobilization;  $U_s$  = units of total enzymatic activity present in the support (activity x immobilized biocatalyst mass – dry basis).

### **Immobilized biocatalyst biochemical properties**

The biochemical properties (pH and temperature effect in the activity, thermal stability) of immobilized biocatalyst on supports hybrid control and modified with PIL supports were determined for to found the best condition of immobilization.

#### **pH and temperature effects on the activity**

The pH effect on the relative activity of IB with and without additives were verified using sodium citrate-citric acid buffers 1 M (pH 4.0 – 5.0), potassium phosphate 0.1 M (pH 6.0 – 8.0). The effect of temperature on the immobilized biocatalysts relative activity were studied at pH 7.0 in the temperature range of 37 to 75°C. The relative activities for both experiments were calculated with the ratio of the immobilized enzyme activity obtained under different temperatures related to the maximum activity determined for the immobilized enzyme.

#### **Thermal stability**

The thermal stability of the immobilized biocatalysts were determined by incubation the samples under the temperatures from 55 to 65°C in water (0.1M phosphate buffer, pH 7.0) for 4 h. Thus, in different time periods samples were removed, immediately cooled and determined its activity in according Cabrera-Padilla et al.<sup>21</sup> with modifications.

### **Operational stability**

The operational stability and reusability of the immobilized system were determined by conducting hydrolysis reactions in consecutive batches using the same immobilized biocatalyst. Each batch consisted of a hydrolysis reaction for 10 min at a temperature of 50°C and pH 7.0.

### **Stability at solvents**

We evaluated the effect of organic solvents with different polarities (ethanol and cyclohexane) in the hydrolytic activity of the immobilized biocatalysts by covalent binding. The biocatalysts were incubated at 40 °C, in equal proportions of sodium phosphate buffer (pH 7.0 and 0.1M) and solvent. Samples were taken at intervals for a period of 72 h. The residual activity was calculated by the ratio between the measured activity and activity at time zero of incubation in according Zhao et al.<sup>28</sup> with modifications.

### **Morphological and physicochemical characterization**

Morphological and physicochemical characterizations were made only for the supports, PHBV silica, hybrid and immobilized biocatalysts (control and more efficient: BI-hybrid C<sub>5</sub>).

### **Scanning electron microscopy (SEM)**

The electronic microscope Hitachi model SU-70 (Scanning Electron Microscopy) was used for the morphological characterization of the surfaces of synthesized supports and immobilized biocatalysts. This characterization was made to ease the understanding of the correlation among microstructure, its flaws and properties.

### **Specific surface area and porous properties**

The surface areas of PHBV-control, silica-control, hybrid-control, hybrid modified with IL C<sub>5</sub> (hybrid-C<sub>5</sub>) and of the lipase immobilized in hybrid support modified with IL C<sub>5</sub> (IB-hybrid C<sub>5</sub>) were calculated using the method of Brunauer-Emmett-Teller. The pores volume and diameters were calculated based on the model developed by Barret, Joyner and Halenda (BJH). The

evaluation of superficial areas were made according to the nitrogen adsorption using the BET device (NOVA 1200e model). The sample were submitted to a pretreatment at 120°C for 48 h, in order to eliminate the water existent in the pores of the supports or immobilized biocatalysts.

### **FTIR - Fourier transformed infrared spectrometry**

Free BCL, prepared supports and immobilized biocatalysts in these supports were analyzed in the spectroscopic FTIR BOMEMMB-100 and the spectrums were obtained in the wavelength range of 600-1800  $\text{cm}^{-1}$  in order to verify the presence of certain functional groups.

### **TGA –Thermogravimetric analysis**

The immobilized biocatalysts thermogravimetric curves (control supports and the modified with PIL) were obtained by using a device simultaneous DTA-TG Shimadzu DTG-60H, under a nitrogen atmosphere, which started at room temperature and increased 600°C, with heating rate of 20°C  $\text{min}^{-1}$ .

## **RESULTS AND DISCUSSIONS**

### **Hybrid support preparation**

Figure 1 shows the tests carried out for the preparation of hybrid supports for which were used the same molar ratio TEOS: ethanol (1: 4.6) and with mass variation of the PHBV, where we can observe the test with the ratio was 2:2.7 (g of PHBV : g of hybrid) showed the highest percentage of weight gained, about 50% recovery of the support in the granulometry used ( $42 \leq X \leq 60$ ) mesh.

In this study, the mass ratio 2:2.7 obtained represent 73% of PHVB and 27% of silica. The literature reports the evaluation of the proportion of hybrid support for the lignin/silica system, in a ratio of 2:3 (41.7% of lignin and 58.3% of silica).<sup>29</sup>



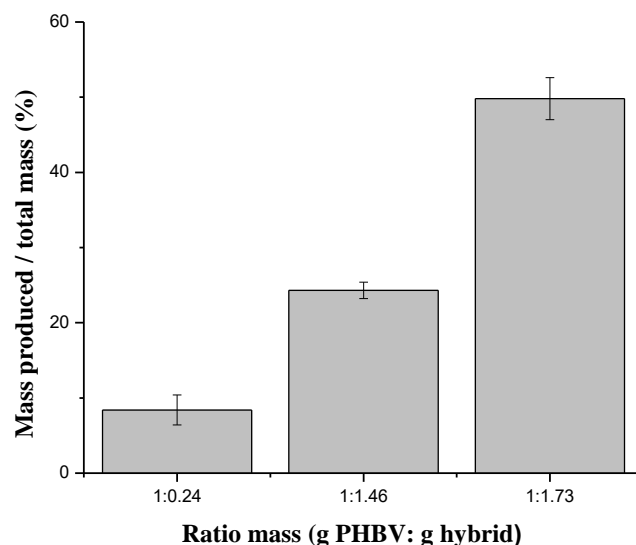


Figure 1: Preparation of hybrid support with different mass ratio (g of PHBV:g of hybrid).

### Study on the influence of ionic liquids as additives of lipase immobilization in different supports

The *Burkholderia cepacia* lipase was immobilized in the control support (silica, PHBV and hybrid without PIL) and in supports modified with protic ionic liquids C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>.

The results showed (Fig. 2) for all biocatalysts immobilized on the supports in the presence of ionic liquids studied the increase of total activity recovery yield with increasing alkyl chain of PIL compared with controls. Values greater total activity recovery yield were obtained for the immobilized biocatalysts on supports hybrid (IB-hybrid-C<sub>3</sub>=103%, IB-hybrid-C<sub>4</sub>=120% and IB-hybrid-C<sub>5</sub>=135%), compared with IB-hybrid-control (90%). These results occurred probably due to the hydrophobicity to the surface support in this case (silica and hybrid), favored the increase in the biocatalysts activity (Fig. 2). In the case of immobilized biocatalysts in PHVB, the effect of ionic liquid was in the immobilization process. Their performance may be attributed to the hydrophobic nature of the support, and effect of cations of the ionic liquids studied. The presence of the ionic liquid C<sub>5</sub> may have acted similarly to the additive polyvinylalcohol (PVA), in the synthesis of the support or during the immobilization method, by changing the hydrophobicity of the microenvironment, as it influences the moisture level of the lipase.<sup>30</sup> The hydrophobicity of an ionic liquid induces the presence of water around the enzyme essential to maintain its active

conformation. Ventura et al.<sup>31</sup> suggest that the hydrophobic ionic liquids possibly induce the superactivity phenomenon of lipase. Souza et al.<sup>22</sup> also report these positive effects in hydrolysis reactions with the use of ionic liquids protic more hydrophobic. In the literature has revealed that the performance of these IL was dependent on both the cation and the anion.<sup>32,33</sup> In this work was studied the same anion and varying the cation of the ionic liquid. The cations effect of ionic liquid through an attempt to correlate the highest yield with such solvent properties as hydrophobicity ( $\log P$ )  $0.25 < 0.78 < 1.31$  and Propionic acid < Butyric acid < Pentanoic acid.<sup>34</sup>

Souza et al.<sup>22</sup> report an increase of the  $Y_a$  (%) of the immobilized biocatalysts containing LIP with longer chains, due to their increased hydrophobicity, surface modification and of the hydration layer. Other results favorable in the use of additives utilized for lipase immobilization has also been reported by Zhao et al.<sup>13</sup> where its use modified the silica surface and verified the more hydrophobic influenced positively the hydration layer to the enzyme, which acted as an stabilizing agent to protection of the inactivation enzyme. This observation could be explained based on the fact that the use  $C_5$  resulted in the improvement in the  $Y_a$  (%) for immobilized biocatalyst in PHBV, silica and hybrid (Fig. 2).

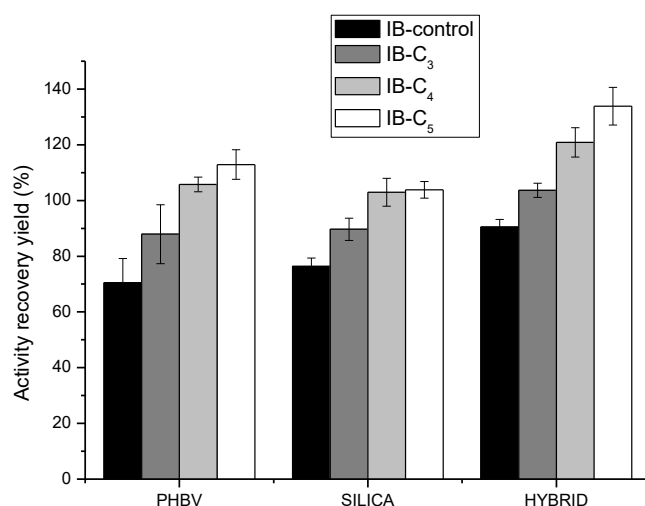


Figure 2: Study of immobilization yields for BCL immobilized in PHBV, silica and support hybrid (control) and the modified with PIL (IB-C<sub>3</sub>), (IB-C<sub>4</sub>) e (IB-C<sub>5</sub>). Error bass are standard deviation from triplicates.

In order to verify the synergetic effect of the kind of PIL the support and lipase, in this work was selected in the hybrid support control and lipase immobilized in the hybrid support modified with

C<sub>5</sub> for the continuity of the study aiming to verify the biochemical, morphological and physicochemical characterization.

## Biochemical characterization

### Temperature and pH effect

The pH effect on the relative activity of immobilized BCL in the control support and the modified with PIL was also verified in the hydrolyze reaction of olive oil, ranging the pH from 4.0 to 8.0, described in Fig. 3(a). It was possible to observe that the immobilized BCL in hybrid supports modified with PIL (IB-C<sub>3</sub>, IB-C<sub>4</sub> and IB-C<sub>5</sub>), as well as the control presented better hydrolytic activity on pH 7.0. Hou et al.<sup>35</sup> determined an optimum pH of 7.0 for the *Candida rugosa* lipase free and immobilized in support hybrid (polidopamina and alginate).

The operational temperature range is one more important factor for the limitation of lipase applications. Therefore, the influence of the temperature was investigated for the biocatalysts immobilized in different supports in the olive oil hydrolyze reaction at different temperatures as shown in Fig. 3(b), where we can observe that the maximum relative activity obtained for the control and the immobilized biocatalyst with C<sub>5</sub> happened at 50°C. While for the BCL immobilized in modified hybrid with C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> the highest relative activity was reached at 65°C.

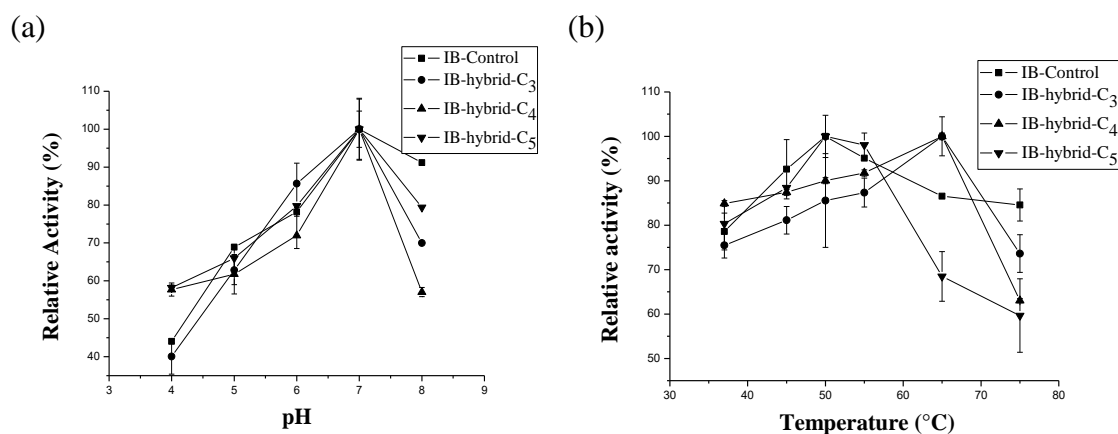


Figure 3: Activity effect on (a) pH and (b) Temperature of biocatalysts immobilized in the hybrid supports (IB control) and modified with protic IL (IB-hybrid-C<sub>3</sub>), (IB-hybrid-C<sub>4</sub>) and (IB-hybrid-C<sub>5</sub>).

## Thermal stability

The biocatalyst immobilized in modified hybrid support with PIL ( $C_5$ ) presented better thermal stability for both studied temperatures (55 and 65°C), as illustrated in Fig. 4(a) and 4(b). It was observed that for IB-hybrid- $C_5$  after 2 h of exposition at 55°C, the residual activity decreased only 40%, being stable until the end of the studied period. While for the temperature 65°C, it was observed a larger decrease of residual activity after 4 h (63%). It is possible that the hybrid support hydrophobic interactions along with the higher hydrophobicity protic ionic liquid may have contributed to the increase of BCL stability in this hybrid support. Ionic liquids could also preserve the compact conformation of enzymes, and reduce the rate of destruction of the secondary structure at high temperatures.<sup>36</sup> Furthermore, some major factors affecting the microenvironment surrounding enzyme, in this case the use of the PIL ( $C_5$ ) before and during immobilization of the lipase with possibility of promoted the increase of thermal stability for IB-hybrid- $C_5$  at 55°C (Fig. 4a). And, at 65°C was observed inactivation of the IB (Fig. 4b).

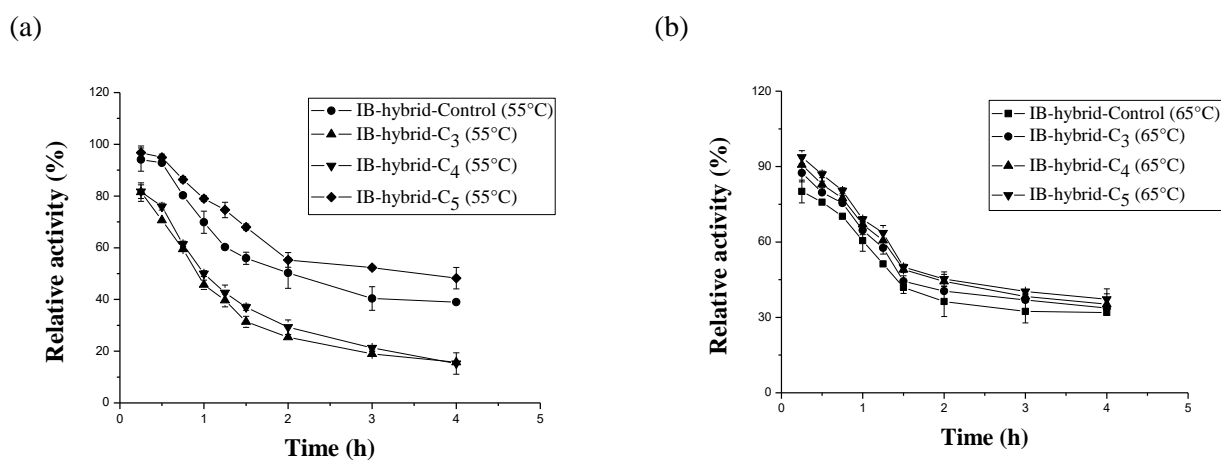


Figure 4: Thermal stability tests for *Burkholderia cepacia* lipase immobilized in the hybrid supports: a) temperature (55 °C) IB-hybrid-control(55 °C) and modified with PIL IB-hybrid-C3 (55 °C), IB-hybrid-C4(55 °C) and IB-hybrid-C5(55 °C), b) at 65 °C, IB-hybrid-control (65 °C) and modified with PIL IB-hybrid-C3 (65 °C).

## Operational stability

The reuse of BCL in different supports showed similar profile, being verified a light alteration for the reuse of BCL immobilized in hybrid support in the presence of  $C_5$ , which reuse was 6 times

keeping 50% of the initial activity, while the control and other IB presented five recycles, as shown in Fig. 5. The alteration can be attributed to the higher hydrophobicity of the reactional mean due to the longer alkyl chain PIL C<sub>5</sub> which favored its reuse, being verified higher operational stability in the presence of this additive. The immobilized biocatalysts in this study were more stable when compared to the reuse of the lipase immobilized in silica modified with C<sub>5</sub> by Souza et al.<sup>37</sup>, who reported that immobilized lipase by physical adsorption method can be reused up to three times and two for immobilized lipase by encapsulation, keeping 50% of your initial activity.

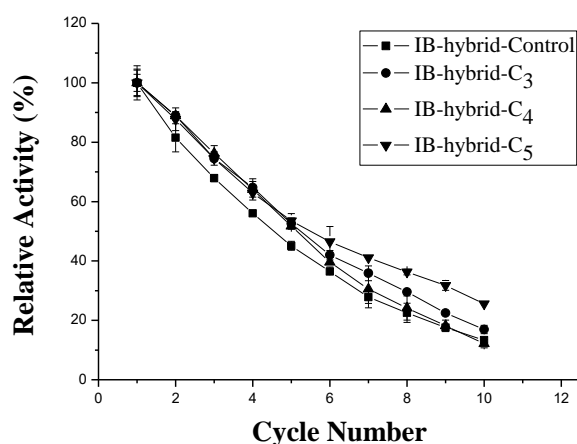


Figure 5: Operational stability tests for *Burkholderia cepacia* lipase immobilized in the hybrid supports (IB-hybrid-control) and modified with protic (IB-hybrid-C<sub>3</sub>), (IB-hybrid-C<sub>4</sub>) and (IB-hybrid-C<sub>5</sub>).

### Stability at solvent

Lipase stability at organic solvent is a vital factor for several industrial applications. This lipase characteristic is beneficial to transform substrates that are openly soluble or unstable in water.<sup>38</sup> This way, it was studied the effect of organic solvents on the BCL activity; two commonly used solvents (cyclohexane and ethanol) were used. In Figure 6 (a), it was observed that in all samples in the presence of cyclohexane there was an increase in the relative activity of the immobilized biocatalysts in the first 7 h, decreasing after this period of time. This phenomenon of initial activation can be attributed to the stabilizing effect of the immobilization process and the presence of ionic liquids. Besides that, the effect of stabilization of the solvents on IB hydrophobic interactions also induce conformational changes improving the enzyme interfacial activation.<sup>39</sup>

This behavior is evidenced by the greater hydrophobicity of cyclohexane as compared to ethanol ( $\log p_{\text{cyclohexane}} 3.34 > \log p_{\text{ethanol}} -0.30$ ).<sup>34</sup> In contrast for the ethanol Figure 6(b), it is observed the activity decrease over time for all IB studied, this behavior is in agreement with the fact the solvent with higher polarity can disturb the hydration layer leading the enzyme to inactivation.<sup>38</sup> The same stability profile for *Candida* lipase sp. 99-125 immobilized in hydrophobic and hydrophilic silica using the same solvents was obtained by Zhao et al.<sup>28</sup>

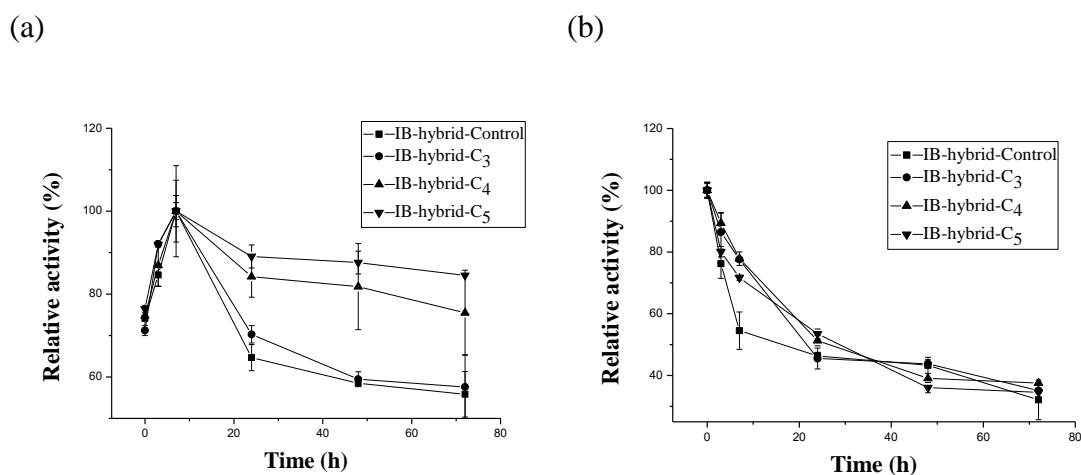


Figure 6: Stability at solvent for lipase *Burkholderia cepacia* from immobilized in the hybrid supports (IB-hybrid-Control) and in the hybrid supports modified with PIL (IB-hybrid-C<sub>3</sub>), (IB-hybrid-C<sub>4</sub>) and (IB-hybrid-C<sub>5</sub>) for (a) cyclohexane e (b) ethanol.

## Morphological and physicochemical characterization

### Scanning electron microscopy – SEM

Micrographs of silica control and PHBV control, hybrid control support, modified hybrid support with protic ionic liquid C<sub>5</sub>, and biocatalysts immobilized in these supports are shown in the Fig. 7(a – f). One can observe that in the micrograph of the hybrid support (Fig. 7c) there were PHBV deposits present on the surface of silica plates, comparing to the isolated supports (Fig. 7a and 7b). One can also observe that in the matrices in the presence of protic ionic liquids (Fig. 7e and 7f) the respective surfaces seem to be more porous. The changes in the biocatalysts microstructure adding ionic liquid would be essential to improve the enzymatic immobilization behavior and subsequently their activity.

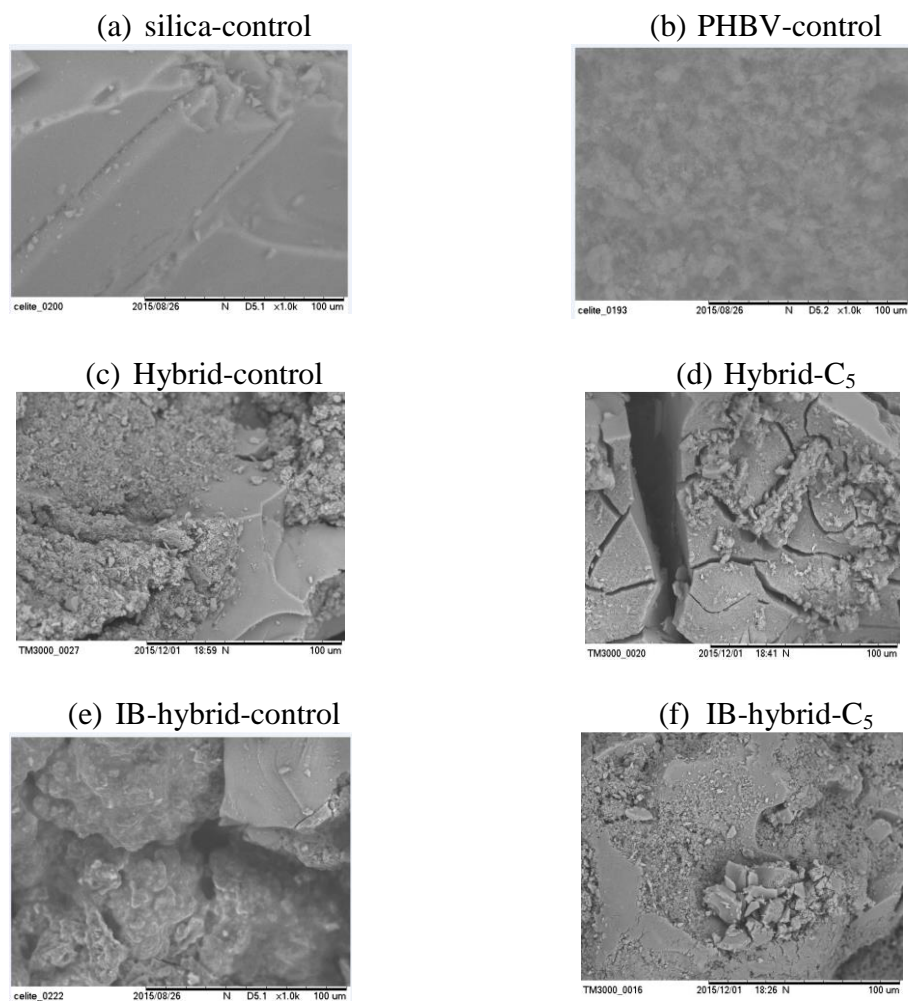


Figure 7: Sample micrographs, support (silica-control), support (PHBV-control), hybrid support (Hybrid-Control), support hybrid with ionic liquid  $C_5$  (Hybrid- $C_5$ ), Biocatalyst immobilized on hybrid support (IB-hybrid-Control) e Biocatalyst immobilized on hybrid support with ionic liquid  $C_5$  (IB-hybrid- $C_5$ ).

### BET physical characterization

Table 2 shows the yields for adsorption-desorption of  $N_2$  for all the supports prepared during this research. It is possible to verify that the PHBV-control support presents low surface area ( $18.82 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) having medium pore diameter of  $34.32 \text{ \AA}$ . On the other hand, silica-control presents high surface area ( $503 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) with medium pore diameter of  $30.68 \text{ \AA}$ , having value similar to the described by Souza et al.<sup>22</sup> which presents  $35 \text{ \AA}$ . We also observed a significant increase in surface area and pore volume, where the ionic liquid was added to the hybrid support preparation process by the sol-gel technique from  $87.37 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  (hybrid-control) to  $173.1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  (hybrid- $C_5$ ).

Hu et al.<sup>19</sup> reported an opposite behavior for silica SBA-15 modified by imidazole based ionic liquids by the sol-gel technique wherein all structural parameters decreased such as surface area, pore volume and pore diameter. These modifications in the structural parameters can be attributed to IL functional group type that has organic groups with different hydrophobicity and spatial conformation, presenting different effects in the pore structure. In order for the biocatalyst immobilized on the hybrid support (IB-hybrid-C<sub>5</sub>), the specific surface area also decreases (63.37 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>), this fact is evidence the immobilization of enzyme within pores of the modified support. Souza et al.<sup>37</sup> also reported the decrease of surface area of the immobilized lipase of *Bacillus sp.* in silica sol-gel, by using Aliquat 336 matrices as additive. All the supports prepared during this research, except PHBV, have surface areas and pore structure suitable for biomolecules immobilization.

Table 2: Structural properties of supports (PHBV-control, silica-control, hybrid-control and hybrid-C<sub>5</sub>) and immobilized biocatalyst (IB-hybrid-C<sub>5</sub>).

Samples	Surface Area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Pore Volume (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	Pore Diameter (Å)
PHBV-control	18.82	0.02785	34.32
Silica-control	503	0.07917	30.68
Hybrid-control	87.37	0.03006	34.28
Hybrid-C <sub>5</sub>	173.1	0.04267	34.44
IB-hybrid-C <sub>5</sub>	63.37	0.03613	34.32

### Structural analysis – Fourier transformed infrared spectroscopy - FTIR

FTIR spectra performed for *Burkholderia cepacia* lipase (BCL), PHBV-control, silica-control, hybrid-control support, hybrid-C<sub>5</sub> and the immobilized biocatalysts IB-hybrid-Control and IB-hybrid-C<sub>5</sub> are shown in Figure 8 a and b. In Fig. 8(a) the FTIR spectra for the hybrid supports with ionic liquid (hybrid-C<sub>5</sub>) and without the additive (hybrid-control), presented similar characteristics to the control supports (PHBV and silica) with bands at 700 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si), 800 cm<sup>-1</sup>(Si-O-Si) and close to 1000 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si) typical of silica,<sup>22</sup> and a strong band at 1720 cm<sup>-1</sup> due to C=O, typical bands of 800 to 975 cm<sup>-1</sup> corresponds to symmetric (-C-O-C-) stretching vibrations characteristic of PHBV.<sup>20</sup> According to Soares et al.<sup>25</sup> lipase has two bands of primary and secondary amino groups at 1600 cm<sup>-1</sup> e 1650 cm<sup>-1</sup>.



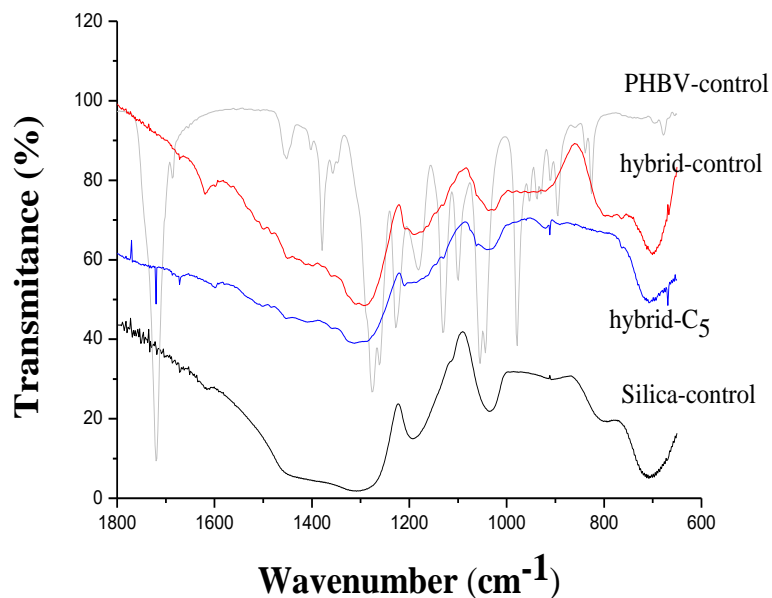


Figure 8: FTIR spectra supports (PHBV-control, Silica-control, hybrid-control, hybrid-C<sub>5</sub>).

In Fig. 8(b) bands of amino groups to silica and PHBV bands are shown in the spectrum of the biocatalyst immobilized in hybrid without IL (hybrid-Control), and with PIL (hybrid-C<sub>5</sub>), being more visible in (IB-hybrid-C<sub>5</sub>), which may be attributed this fact to the positive effect of the ionic liquid.

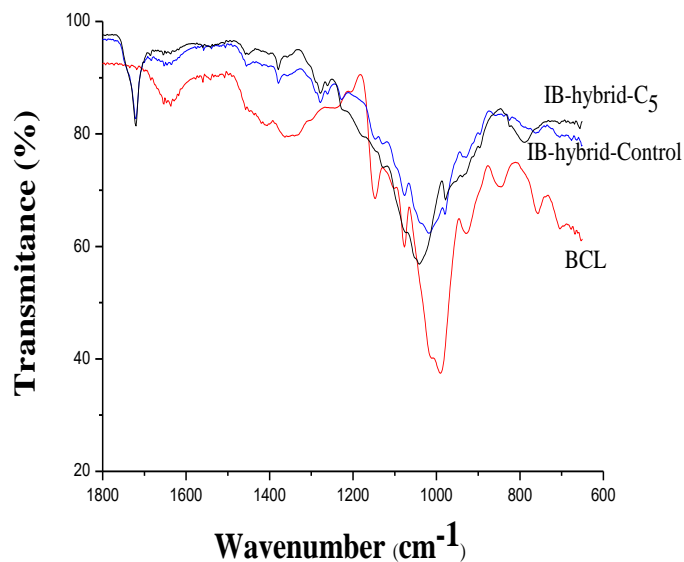


Figure 9: FTIR spectra free enzyme (BCL), biocatalysts immobilized (IB-hybrid-Control and IB-hybrid-C<sub>5</sub>).

### Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermogravimetric analysis allows the determination of temperature interval in which the heated sample suffers a conformational alteration showing a mass loss profile. This way, it is possible to characterize the organic composition as well as the water loss according to the prepared samples thermal degradation. The mass losses (Table 3) and the first derivative of the curves of TGA (DTG) can be observed in the Supporting material for the silica and PHBV-control (Fig. 10), hybrid-Control and hybrid-C<sub>5</sub> (Fig. 11) and IB-hybrid-Control and IB-hybrid-C<sub>5</sub> (Fig. 12).

Table 3: Total and partial mass loss observed in supports control (PHBV-control and silica-control) hybrid supports (hybrid-control and hybrid-C<sub>5</sub>) and biocatalysts immobilized (IB-hybrid-control and IB-hybrid-C<sub>5</sub>).

<b>Experiment</b>	<b>0 – 200 °C</b>	<b>200 – 400 °C</b>	<b>400 – 600 °C</b>	<b>Total Mass loss (%)</b>
Silica-control	17.46	2.01	1.95	21.40
PHBV-control	0.01	98.65	0.17	98.94
Hybrid-Control	5.17	21.98	2.38	29.40
Hybrid-C <sub>5</sub>	5.45	23.99	3.20	32.64
IB-hybrid-Control	6.85	30.81	5.00	42.59
IB-hybrid-C <sub>5</sub>	7.90	31.76	4.70	44.37

Figure 10 shows that for silica the mass loss was higher until the temperature of 200 °C losing approximately 81% of total mass loss (Table 3). This behavior can be attributed to the water molecules removal in its surface of in the material interstices.<sup>40</sup> The organic molecules decomposition and combustion happen at temperatures over 200 °C and can be observed for PHBV-control, which mass loss was 98.65% (Table 3).

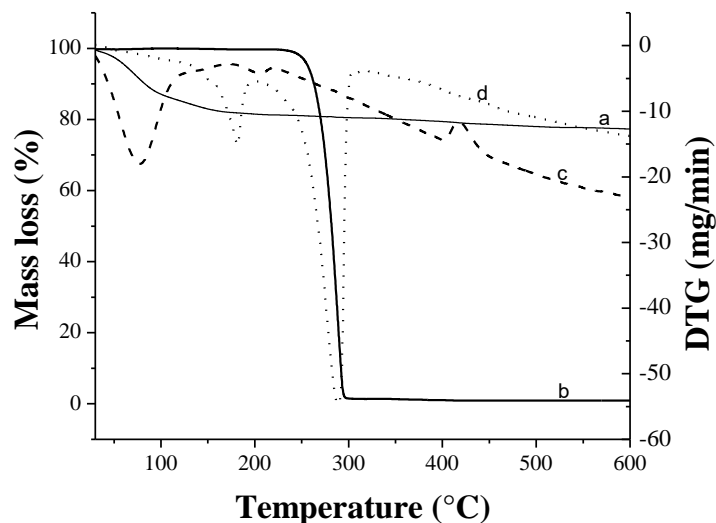


Figure 10: Silica-control curves: TGA (continuous line, [a]) and DTG (dashed line, [c]) and PHBV-control: TGA (continuous line, [b]) and DTG (dotted line, [d]).

In Fig. 11 was possible to observe that both hybrid supports (hybrid-control and hybrid-C<sub>5</sub>) presented similar degradation mechanisms, being thermally stable until 200 °C losing only 5% of its initial mass, due the presence of water. Over this temperature, the DTG curve shows the highest degradation rate centered at 280 °C, and another one between 380 and 395 °C with mass loss of 22 and 24% (Table 3) for Hybrid-control and Hybrid-C<sub>5</sub> respectively, due the presence of organic compounds,<sup>41</sup> coming from PHBV-control. Finally, the last step of degradation at 500 °C can be observed with a loss equivalent to 3% (Table 3) for both hybrid supports.

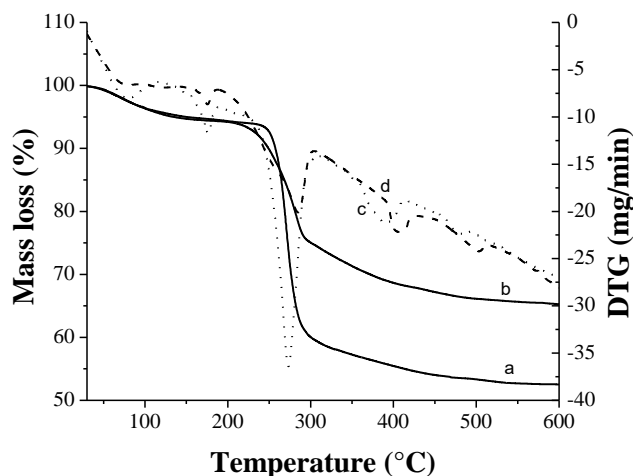


Figure 11: The curves of hybrid-control: TGA (continuous line, [a]) and DTG (dashed line, [c]) and of hybrid-C<sub>5</sub>: TGA (continuous, [b]) and e DTG (dotted line, [d]).

Figure 12 shows similar profiles of TGA (DTG) curves for both immobilized biocatalysts. According to Table 3 it is observed an increase of mass loss (IB-hybrid-Control= 31% and IB- hybrid-C<sub>5</sub> =32%) after 200 °C when compared to the hybrid supports (hybrid-control = 22% and hybrid-C<sub>5</sub>= 24%), fact possibly influenced by the lipase presence. Even though, it was observed – after 400 °C heating – increase in the mass loss of approximately 3% to 5% in the hybrid support and immobilized biocatalyst respectively (Fig. 12 and Table 3), possibly due the presence of epoxy groups. Similar results were reported by Zhou et al.<sup>40</sup> who have also obtained an increase in mass loss at high temperatures due to the presence of the activating agent used in immobilization.

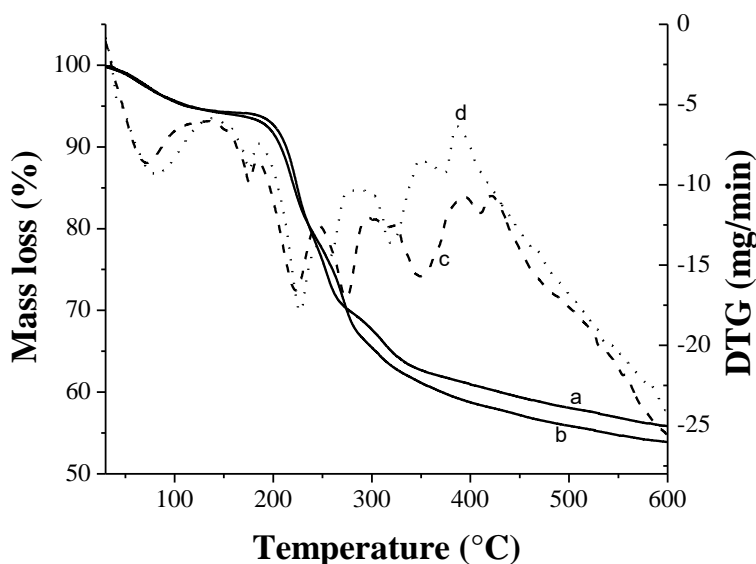


Figure 12. The curves of IB-hybrid-Control: TGA (continuous line, [a]) and DTG (dashed line, [c]) and of IB-hybrid-C<sub>5</sub>: TGA (continuous line, [b]) and DTG (dotted line, [d]).

## CONCLUSION

The *Burkholderia cepacia* lipase was immobilized successfully in hybrid support (PHBV and silica) modified with PIL through covalent binding. The addition of protic ionic liquid during the preparation of support hybrid resulted in an improving in their morphological and physico-chemical characteristics. The most efficient biocatalyst was IB-hybrid-C<sub>5</sub> presenting total activity recovery yield of 135% (Ya) above the immobilized biocatalysts IB-hybrid-C3 (Ya = 103%) and

IB-hybrid-C4 ( $Y_a = 120\%$ ). This fact can be attributed to the increase of the system hydrophobic character, making the use of longer alkyl chain PIL more efficient for the BCL immobilization in hybrid supports. The presence of longer chain PIL ( $C_5$ ) also influenced positively in the thermal and operational stability of IB. Therefore, the use of modified supports offers new perspectives for the industry, increasing this way its efficiency, stability, performance and reuse.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The Authors are grateful for the financial support from the Brazilian research funding agencies CNPq, CAPES and FAPITEC/SE.

## REFERENCES

- 1 Zivković LTI, Zivković LS, Babić BM, Soski, MJK, Jokić BM and Karadžić IM, immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zircônia. *Biochem Eng J* **93**:73-83 (2014).
- 2 Sheldon RA, characteristic features and biotechnological applications of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Microbiology Biotechnol* **92**:467–477 (2011).
- 3 Zhao X, Qi F, Yuan C, Du W and Liu D, lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable Sustainable Energy Rev* **44**:182-197 (2015).
- 4 Jeon YS, Lei J, Chung DJ and Kim J, sol-gel derived organic hybrid gels based on poly (2- hydroxyethyl aspartamide) and sílica. *J Ind Eng Chem* **15**:544-549 (2009).
- 5 Arakawa M., Sukata K, Shimada M and Agari Y, organic–inorganic hybrid materials: Preparation and properties of higher silica containing polycarbonate–silica hybrid materials. *J applied polymer Sci* **100**:4273-4279 (2006).
- 6 Jose NM and Prado LAS, Organic Inorganic Hybrid Materials: Preparation and some applications. *Quim Nova* **28**:281-288 (2005).

- 7 Zou B, Hu Y, Yu D, Xia J, Tang S, Liu W, Huang H, Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA15. *Biochem Eng J* **53**:150-153 (2010).
- 8 Liu T, Wang X, Li Q, Wang J, Yan Y, improving catalytic performance of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on macroporous resin NKA. . *J Mol Catal B: Enzym* **71**:45-50 (2011).
- 9 Zou B, Hu Y, Yu D, Jiang L, Liu W, Song P, functionalized ionic liquid modified mesoporous silica SBA15: A novel, designable and efficient carrier for porcine pancreas lipase. *Colloids Surf B* **88**:93– 99 (2011).
- 10 Souza RL, Faria ELP, Figueiredo RT, Fricks AT, Zanin GM, Santos OAA, Lima AS, Soares CMF, use of polyethylene glycol in the process of sol-gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. *J Therm Anal Calorim* **115**:1-6 (2014).
- 11 Zou B, Song C, Xu X, Xia J, Huo S, Cui F, enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. *Appl Surf Sci* **311**:62-67 (2014).
- 12 Naushad M, ALOthaman ZA, Khan AB and Ali M, effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. *Int J Biol Macromol* **51**:555- 560 (2012).
- 13 Zhao H, methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids – a review. *J Chem Technol Biotechnol* **85**:891–907 (2010).
- 14 Gao J, Ndong RS, Shiflett MB and Wagner NJ, creating Nanoparticle Stability in Ionic Liquid [C<sub>4</sub>mim][BF<sub>4</sub>] by Inducing Solvation Layering. *ACS Nano* **9**:3243–3253 (2015).
- 15 Ríos AP, Rantwijk F and Sheldon RA, effective resolution of 1-phenil ethanol by *Candida antarctica* lipase B catalised acylation with vinyl acetate in protic ionic liquid (PILs). *Green Chem* **14**:1584-1588 (2012).
- 16 Mattedi S, Carvalho PJ, Coutinho JAP, Alvarez VH, Iglesias M, high pressure CO<sub>2</sub> solubility in N-methyl-2-hydroxyethylammonium protic ionic liquids. *J Supercrit Fluids* **56**:224-230 (2011).
- 17 Jiang Y, Guo C, Xia H, Mahmood I, Liu C, Liu H, magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: enzyme activity in catalyzing esterification. . *J Mol Catal B: Enzym* **58**:103-109 (2009).

- 18 Liu Y, Chen D, Yan Y, Peng C, Xu L, biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. *Bioresour Technol* **102**:10414-10418 (2011).
- 19 Hu Y, Tang S, Jiang L, Zou B, Yang J and Huang H, immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *J Process Biochem* **47**:2291-2299 (2012).
- 20 Cabrera-Padilla RY, Melo EB, Pereira MM, Figueiredo RT, Fricks AT, Franceschi E, Lima A S, Silva DP and Soares CMF, use of ionic liquids as additives for the immobilization of lipase from *Bacillus* sp., . *J Mol Catal B: Enzym* **1**:5-15 (2015).
- 21 Cabrera-Padilla RY, Lisboa MC, Pereira MM, Figueiredo RT, Franceschi E, Fricks AT, Lima AS, Silva DP and Soares CM F, immobilization of *Candida rugosa* lipase onto an eco-friendly support in the presence of ionic liquid. *Bioprocess Biosyst Eng* **38**:805–814 (2015).
- 22 Souza RL, Faria ELP, Figueiredo RT, Freitas LS, Iglesias M, Mattedi S, Zanin GM, Santos OAA, Coutinho JAP, Lima AS and Soares CMF, protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol–gel. *Enzyme and Microb Technol* **52**:141– 150 (2013).
- 23 Oliveira MVS, Da Rós PCM, Mattedi S, de Castro HF, Soares CMF and Lima AS, transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. *Acta Sci Technol* **36**:445-451 (2014).
- 24 Barbosa AS, Lisboa JA, Silva MAO, Carvalho NB, Pereira MM, Fricks AT, Mattedi S, Lima, AS, Franceschi E, and Soares CMF, the novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. *Quim Nova* **39**:415-422 (2016).
- 25 Soares CMF, Santos AO, Olivo JE, Castro HF, Moraes FF and Zanin GM, influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. . *J Mol Catal B: Enzym* **29**:69-79 (2004).
- 26 Paula AV, Moreira ABR, Braga LP and Castro F, comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Quim nova* **31**:35-40 (2007).

- 27 Soares CMF, Castro HF, Moraes FF and Zanin GM, characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl Biochem Biotechnol* **79**:745–758 (1999).
- 28 Zhao B, Liu X, Jiang Y, Zhou L, He Y, Gao J, immobilized Lipase from *Candida* sp. 99–125 on Hydrophobic Silicate: Characterization and Applications. *Appl Biochem Biotechnol* **173**, 1802-1814 (2014).
- 29 Qu Y, Tian Y, Zou B, Zhang J, Zheng Y, Wang L, Li, Y.; Rong C and Wang Z, a novel mesoporous lignina/silica hybrid from rice husk produced by a sol-gel method. *Bioresource Technol* **101**:8402-8405 (2010).
- 30 Mohidem N A, Mat H B, catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol-gel silica with additives. *J Sol-Gel Sci Technol* (2011).
- 31 Ventura SPM, Santos LDF, Saraiva JÁ and Coutinho JAP, ionic liquids microemulsions: the key to *Candida antarctica* lipase B superactivity. *Green Chem* **14**:1620–1625 (2012).
- 32 Zhao H, methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids: specific ion effects. *J Chem Technol Biotechnol* **91**:25-50 (2015).
- 33 Lin X, Zou Y, Zhao K, Yang T, Halling P, Yang Z, tetraalkylammonium ionic liquids as dual solvents-catalysts for direct synthesis of sugar fatty acid esters. *Journal Surfact Deterg* **19**:511- 517 (2016).
- 34 (Chemispider (<http://www.chemspider.com/Search.aspx>)).
- 35 Hou C, Qi Z and Zhu H, preparation of Core-shell Magnetic Polydopamine/Alginate Biocomposite for *Candida rugosa* lipase Immobilization. *Colloids Surf, B* **6**:24-32 (2015).
- 36 Van Rantwijk YT, Secundo F, Sheldon RA, structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Green Chem* **8**:282–286 (2006).
- 37 Souza RL, Resende WC, Barão CE, Zanin GM, Heizir, Castro F, Santos OAA, Fricks AT, Figueiredo RT, Lima AS and Soares CMF, Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol–gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. *J Mol Catal B: Enzym* **84**:152-159 (2012).



- 38 Abdulla R and Ravindra P, characterization of cross-linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. J Taiwan Inst Chem Eng **44**:545-551 (2013).
- 39 Pizarro C, Brãnes MC, Markovits A, Fernández-Lorente G, Guisán JM, Chamy, R, influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. . J Mol Catal B: Enzym, **78**:111–118 (2012).
- 40 Zhou Z, piepenbreier F., Marthala VR, Karbacher K and Hartmann M, immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent binding and crosslinking. Catal Today **243**:173–183 (2015).
- 41 Roviello G, Ricciotti L, Ferone C, Colangelo F and Tarallo O, fire resistant melamine based organic-geopolymer hybrid composites. Cement Concrete Comp **59**:89–99 (2015).

### 5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados finais obtidos neste trabalho, onde foi estudado a influência de líquidos iônicos próticos na preparação de suportes híbridos para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* através do método de ligação covalente nos suportes de PHBV, sílica e híbrido (PHBV-sílica), conclui-se que:

- ✓ O biocatalisador mais eficiente foi o (BI-C<sub>5</sub>) apresentando um aumento em até duas vezes no rendimento de imobilização quando comparados com os suportes controle.
- ✓ O uso do LIP de maior cadeia alquílica se apresentou mais eficiente para a imobilização de LBC em suportes híbridos;
- ✓ Os BIs apresentaram melhor estabilidade em solvente em presença do ciclohexano;
- ✓ O biocatalisador imobilizado em suporte híbrido modificado com o LIP C<sub>5</sub> apresentou 6 reusos;
- ✓ A presença de LIP de cadeias maiores (C<sub>5</sub>) influenciaram também de forma positiva na estabilidade térmica do BI;
- ✓ O LIP provocou aumento significativo na área de superfície e no volume dos poros dos suportes modificados.

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AGUIAR, J. E.; BEZERRA, B. T. C.; BRAGA, B. D. M.; LIMA, P. D. D. S.; NOGUEIRA, R. E. F. Q.; DE LUCENA, S. M. P.; DA SILVA, I. J.; Adsorption of Anionic and Cationic Dyes from Aqueous Solution on NonCalcined Mg-Al Layered Double Hydroxide: Experimental and Theoretical Study. *Separation Science and Technology*, v.48, p.2307-2316, 2013.
- ÁLVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTORD, M.; AZNARB, M.; IGLESIAS, M.; Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid Phase Equilibria*, v.299, p.42–50, 2010.
- ARAKAWA, M.; SUKATA, K.; SHIMADA, M.; AGARI, Y.; Organic–inorganic hybrid materials: Preparation and properties of higher silica containing polycarbonate–silica hybrid materials. *Journal of applied polymer Science*, v. 100, 4273-4279, 2006.
- ARROYO, M.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINESTERRA, J. V.; Thermal stabilization of immobilized lipase B from *candida antarctica* on diferente supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, p.3-12, 1999.
- ASHJARI, M.; MOHAMMADI, M.; BADRI, R. Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 115, p. 128–134, 2015.
- ASLANOV, L. A.; Ionic liquids: Liquid structure. *Journal of Molecular Liquids*, v.162, p.101-104, 2011.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F.; Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd. ed. New York: McGraw-Hill, p.984, 1986.
- BARBOSA, A. S.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI E.; SOARES, C. M. F.; Immobilization of lipase by encapsulation in silica aerogel. *Química Nova*, v. 37, 969-976, 2014.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDES-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida Antarctica*. *Process Biochemistry*, v.47, p. 1220–1227, 2012.

- BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H.; GALLAS, M. R.; Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. *Química Nova*, v. 32, p. 926-1933, 2009.
- BISKERSTAFF, G. F.; SCHMAUDER, H. P.; Immobilization of enzymes and cells. In: *Methods in Biotechnology*, v.1, p.1-11, 1997.
- BON, E. P. S.; FERRARA M. A.; CORVO M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro: Inteciência, 2008.
- BOROS, Z.; WIESER, D.; MARKUS, M.; ABAHAZIOVA, E.; MAGYAR, A.; TOMIN, A.; KOCZKA, B.; KOCZKA, P.; POPPE, L. Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations. *Process Biochemistry*, v.48, p. 1039–1047, 2013.
- BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Appl Biochem Biotechnol*, v.146, p.173–187, 2008.
- CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M.; Engenharia enzimática, 1ª ed., Lisboa: Lidel, 2003.
- CABRERA-PADILLA, R. Y.; LISBOA, M. C.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A. S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. F.; Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. *Journal of industrial Microbiology & Biotechnology*, v.3, p.3-15, 2011.
- CABRERA-PADILLA, R. Y.; ALBUQUERQUE, M.; FIGUEIREDO, R. T.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; SANTOS, O. A. A.; LIMA, A. S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. F.; Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, *Bacillus* sp. ITP-001, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.36, p. 1385–1394, 2013.
- CABRERA-PADILLA, R. Y.; MELO, E. B.; PEREIRA, M. M.; FIGUEIREDO R. T.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, Á. S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. F.; Use of ionic liquids as additives for the immobilization of lipase from *Bacillus* sp., *Journal Of Chemical Technology And Biotechnology*, v.1, p.5-15, 2014.
- CABRERA-PADILLA, R. Y.; LISBOA, M. C.; PEREIRA, M. M.; FIGUEIREDO, R. T.; FRANCESCHI, E.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; SILVA D. P.; SOARES, C. M. F.; Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto an eco-friendly support in the presence of ionic liquid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.38, p.805–814, 2015
- CASTRO, H. F.; Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, p.146-156, 2004.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, v.32 (1), p.175-187, 2009.

- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipase. *Química Nova*, v.38, p.399-409, 2014.
- CARVALHO, N. B.; SOARES, C. M. F.; BARBOSA, J. M. P.; OLIVEIRA, M. V. S.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S. Biochemical properties of *Bacillus* sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol gel process. *Química Nova*, v.36, p. 52 - 58, 2013.
- CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; SILVA, A. A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the support nature on catalytic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.100, p.59– 67, 2014.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, p.623-630, 2004.
- FAN, Y; CAO, X; HU, T; LIN, X; DONG, H; ZOU, X. Enhancement of Enzymatic Activity Using Microfabricated Poly( $\epsilon$ - caprolactone)/Silica Hybrid Microspheres with Hierarchically Porous Architecture. *The Journal of Physical Chemistry*, v.120, p.3955–3963.
- FERNANDES, I. A.; NYARIA, N. L. D.; OLIVEIRA, J. V.; RIGOC, E.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B.; PERGHERE, S. B. C.; OLIVEIRA, D.; Nanopartículas de poli-hidroxibutirato-co-valerato como suporte para a imobilização da lipase de *candida antarctica* fração b, *Química Nova*, v. 37, p. 331-336, 2014.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M., SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Adv.*, v.3, p. 423-578, 2012.
- FERNANDEZ-LORENTE, PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M.; Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnology and bioengineering*, v.97, p.242-250, 2007.
- GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.6, p. 345-348, 2008.
- GAO, J.; NDONG, R. S.; SHIFLETT, M. B.; WAGNER, N. J.; Creating Nanoparticle Stability in Ionic Liquid [C<sub>4</sub>MIM][BF<sub>4</sub>] by Inducing Solvation Layering. *ACS Nano*, v. 9, p.3243–3253, 2015.
- GARCIA, H. S.; MALCATA, F. X.; HILL Jr., C. G.; AMUNDSON, C. H.; Use of *Candida rugosa* lipase immobilized in a spiral wound membrane reactor for the hydrolysis of milkfat. *Enzyme and microbial technology*, v.14, p.535-545, 1992.
- GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, v. 63, p. 1721–1754, 2007.

- GONÇALVES, A. M.; SCHUCHT, E.; MATTHIJS, G.; AIRES BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S.; GIL, M. H.; Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, p.60-66, 1999.
- GROSSO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PIRES-CABRAL, P. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal Food engineering*, v.115, p.475, 2013.
- HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E.; Understanding enzyme immobilization. *Chemical. Soc. Rev.*, p.38, p.453–468, 2009.
- HARA, A.P.; MIKKOLAB, J.P.; MURZINB, D.Y.; KANERVA, L.T.; Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.67, p.129-134, 2010.
- HARA, P.; HANEFELD, U.; KANERVA, LT. Sol-gels and corss-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 50: p.80 – 86, 2008.
- HOU, C.; ZHU, H.; WU, D.; LI, Y.; HOU, K.; JIANG, Y.; LIM, Y. Immobilized lipase on macroporous polystyrene modified by PAMAM-dendrimer and their enzymatic hydrolysis Process. *Biochemical*, v.49: 244, 2014.
- HOU, C.; QI, Z.; ZHU, H. Preparation of Core-shell Magnetic Polydopamine/Alginate Biocomposite for *Candida rugosa* lipase Immobilization. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, v.128, p.544-551, 2015.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T.; Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnology*, v.16, p.396-403, 1998.
- JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P.; Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. *Biotechnology*, v.28, p.253-64, 2008.
- JEON, Y. S.; LEI, J.; CHUNG, D. J.; KIM, J.; Sol-gel derived organic hybrid gels based on poly (2-hydroxyethyl aspartamide) and sílica. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.15, p.544-549, 2009.
- JOSE, N. M.; PRADO, L. A. S.; Materiais híbridos orgânicos inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. *Química Nova*, v.28, p.281-288, 2005.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N.; Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v.47, p.555–569, 2012.
- KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. Enzyme Technology. In: *Biotechnology – A Comprehensive Treatise in 8 vol.* Edited by H.J.REHM and G.REED: v.7 Editor John F. Kennedy, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft., p. 347- 404, 1987.

- KIM, J.; GRATE, P. R.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, v.61, p.1017-1026, 2006.
- KRAJEWSKA, B.; Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations. *Enzyme and Microbial Tecnology*, v.35, p.126-139, 2004.
- KUMAR, D.; NAGAR, S.; BHUSHAN, I.; KUMAR, L.; PARSHAD, R.; GUPTA, V. K. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.87, p. 51, 2013.
- LEE, S. H.; DOAN, T. T. N.; HA, S. H. H.; CHANG, W. J. Influence of ionic liquids as additives on sol–gel immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 47: p. 129–134, 2007.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; *In:Biotechnologia Industrial*, v.3, p.454-476, 2001.
- MALCATA, F. X.; GARCIA, H. S.; HILL Jr., C. G.; AMUNDSON, C. H.; Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor. Part. I. Lipase adsorption studies. *Biotechnology and Bioengineering*, v.39, p. 647-657, 1992.
- MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL Jr., C. G.; AMUNDSON, C. H.; Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – a review. *Journal of the American oil Chemists Society*, v.67, p.890-910, 1990.
- MANJON, A.; IBORRA, J. L.; AROCAS, A.; Short-chain ester synthesis by immobilized lipase in organic media. *Biotechnology Letters*, v.13, p.339-344, 1991.
- MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENT, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, v.71, p.53–57, 2015.
- MATEO C.; PALOMO JM.; FERNANDEZ-LORENTE G.; GUIBAN JM.; FERNANDEZ LAFUENTE R.; Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microbiol Technology*, v.40: p. 1451-1463, 2007.
- MATTEDI, S.; CARVALHO, P. J.; COUTINHO, J. A. P.; ALVAREZ, V. H.; IGLESIAS, M.; High pressure CO<sub>2</sub> solubility in N-methyl-2-hydroxyethylammonium protic ionic liquids. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 56, p. 224-230, 2011.
- MAURY, S.; BUISSON, P.; PERRARD, A.; PIERRE, A. C. Compared esterification kinetics of the lipase from *Burkholderia cepacia* either free or encapsulated in a silica aerogel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32: p. 193 – 203, 2005.
- MENDES, A. A.; Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in

biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.68, p.109–115, 2011.

- MENDES, A.A.; DE CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C.. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. *Química Nova*, v.36, p.245-251, 2013.
- MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M. D.; LANDETA, C.; AGUD, I.; SOLOZABAL, R.; LASCARAY, J. M.; RENOBALLES, M.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L.; Immobilization of candida rugosa lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, v.15, p. 239-247, 1993.
- NASSREDDINE, S; KAROUT, M.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A.C. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. *Journal Applied Catalysis A: General*, v. 344: p.70-77, 2008.
- NAUSHAD, M.; ALOTHAMAN, Z. A.; KHAN, A. B.; ALI, M.; Effect of ionic liquido activity, stability, and structure of enzymes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.51, p.555-560, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; Lehninger princípios de bioquímica. São Paulo, 2006.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S.; Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*, v. 96, p.769-77, 2005.
- NOWACKA, M.; KLAPISZEWSKI, L.; NORMAN, M.; JESIONOWSKI, T.; Dispersive evaluation and surface chemistry of advanced, multifunctional silica/lignin hybrid biomaterials. *Central European Journal of Chemistry*. v. 11, p. 1860-1873, 2013.
- OLIVEIRA, M. V. S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. *Acta Scientiarum. Technology*, v.36, (3), p. 445-451, 2014.
- ORÇAIRE, O; BUISSON, P; PIERRE, A.C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.42, p.106–113, 2006.
- PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Lipase-lipase interactions a a new tool to immobilized and modulate the lipase properties. *Enzyme and Microbial Tchnology*, v.36, p.447-454, 2005.
- QU, Y.; TIAN, Y.; ZOU, B.; ZHANG, J.; ZHENG, Y.; WANG, L.; LI, Y.; RONG, C.; WANG, Z.; A novel mesoporous lignina/silica hybrid from rice husk produced by a sol-gel method. *Bioresource Tecnology*, v.101, p. 8402-8405, 2010.



- REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J.; Efficient immobilization of lipase by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnology and Bioengineering*, v.49, p.527-534, 1996.
- RESLOW, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATIASSON, B. On the importance of the support material for bioorganic synthesis – influence of material partition between solvente, enzyme and solid support in water-poor reaction media. *European Journal of Biochemistry*, Belfast, v.172, p.573-578, 1988.
- RÍOS, A. P.; RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A.; Effective resolution of 1-phenil etanol by *Candida antarctica* lipase B catalised acylation with vinyl acetate in protic ionic liquid (PILs). *Green Chemistry*, v. 14, p. 1584-1588, 2012.
- ROOSEN, C.; MÜLLER, P.; GREINER, L. Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Applied Microbiol and Biotechnology*, v. 81: p. 607-614, 2008.
- ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S.; Immobilized Enzymes and Cells. *Adam Hilger: Bristol and Philadelphia*, cap. 5, 1987.
- RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; COSTA, D. M.; CABRERA-PADILLA, R.Y.; CASTRO, R. S. S.; SOUZA, E. R.; TEIXEIRA, J. A. C.; QUEISSADA, D. D. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140013156, data de depósito: 20/01/2014, título: "UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2014.
- SCHERER, R. P.; DALLAGO, R. L.; PENNA, F. G.; BERTELLA, F.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; PERGHER, S. B. C. Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. *Biocatalys Agric. Biotechnol*, v.1, p.290, 2012.
- SHELDON R. A.; Characteristic features and biotechnological applications of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Microbiology Biotechnol*, v.92, p.467–477, 2011.
- SIMÕES A. S. Y.; MORI R. Y.; FARIA R.; CASTRO H. F.; Desempenho da matriz híbrida sílica-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *candida rugosa*. *Química Nova*, v.34, p.33-38, 2011.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.39, p.69–76, 2006.
- SOARES, C. M. F. ; CASTRO, H. F.; ITAKO, J. E.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel bioencapsulates for hydrolysis and synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121: p. 845-859, 2005.

- SOARES, C. M. .; SANTOS, A. O.; OLIVO, J. E.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.29, p.69-79, 2004.
- SOUZA R. L., FARIA E. L. P.; FIGUEIREDO R. T.; FREITAS L. S.; IGLESIAS M.; MATTEDI S.; ZANIN G. M.; SANTOS O. A. A.; COUTINHO J. A. P.; LIMA A. S.; SOARES C. M. F.; Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, v.52, p.141– 150, 2013.
- SOUZA, R. L.; RESENDE, W.C.S.; BARÃO, C.E.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.; SANTOS, O.A.A. ; FRICKS, A.T. ; ITP/UNIT, R. T. F. - P.; LIMA, A.S. ; SOARES, C. M. F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP - 001. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 2012.
- TRODLER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling of solvent-solvent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *BMC Structural Biology*, p.1-13, 2009.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical: physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.9, p.113-148, 2000.
- XIE, K.; YU, Y.; SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, v.78, p.799, 2009.
- YANG, F.; WEBWE, T. W.; GAINER, J. L.; CARTA, G.; Synthesis of lovastatin with immobilized *candida rugosa* lipase in organic solvents: effects of reaction conditions on initial rates. *Biothcnology and Bioengineering*, v.56, p.671-680, 1997.
- YUE, C.; FANG, D.; LIU, L.; YI, T-F.; Synthesis and application of task-specific ionic liquids used as catalysts and/or solvents in organic unit reactions. *Journal of molecular Liquids*, v.163, p.99-121, 2011.
- ZARCULA, C.; CORÎCI, L.; CROITORU, R.; URSOIU, A.; PETER, F.; Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.65, p.79–86, 2010.
- ZHAO, H.; Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids – a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p. 891–907, 2010.
- ZHAO, X.; QI F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D.; Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44, 182-197, 2015.
- ZHAO, B., LIU, X., JIANG, Y., ZHOU, L., HE, Y., GAO, J.; Immobilized Lipase from *Candida* sp. 99–125 on Hydrophobic Silicate: Characterization and Applications, p.1802-1814, 2014.

- ZHU, J.; SUN, G. Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities. *React. Funct. Polym*, v.72, p. 839, 2012.
- ZHU, X.; ZHOU, T.; WU, X.; CAI, Y.; YAO, D.; XIE, C.; LIU, D.; Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v.72: p.145 – 149, 2011.
- ZIVKOVIĆ, L. T. I.; ZIVKOVIĆ, L. S.; BABIĆ, B. M.; SOSKI, M. J. K.; JOKIĆ, B. M.; KARADŽIĆ, I. M.; Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. *Biochemical Engineering Journal*, p.93, v.73-83, 2014.

## Capítulo 7

### 7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- ✓ Realizar a imobilização da lipase em suporte híbrido através da técnica de imobilização por ligação covalente multipontual e encapsulamento;
- ✓ Utilizar diferentes aditivos durante a preparação do suporte híbrido e a imobilização da lipase;
- ✓ Verificar o potencial de aplicação dos biocatalisadores imobilizados neste trabalho e os que ainda serão sintetizados por novos métodos de imobilização supracitados em reação de transesterificação por métodos convencionais e não convencionais, como micro-ondas e ultrassom;
- ✓ Aplicar os biocatalisadores imobilizados já sintetizados e os que serão produzidos em sistemas reacionais de esterificação para síntese de ésteres derivados de carboidratos pelos métodos convencionais e não convencionais, como micro-ondas e ultrassom.

## 8. ANEXO

### LISTA DE DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Durante esse período de estudo, até o presente momento, publicaram-se os resultados em diferentes meios de divulgação, como a seguir listadas;

MARTINS, S. R. S.; CABRERA-PADILLA, R. Y. **Influência de líquidos iônicos próticos na produção de suportes híbridos.** In: 17ª Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes. “Luz, Ciência, tecnologia e Educação”, 2015.

MARTINS, S. R. S.; JESUS, A. R.; BARBOSA, A. S.; FRIKS, A. T.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M.; CABRERA-PADILLA, R. Y. **Utilização de líquidos iônicos na preparação de suportes híbridos.** In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos/ XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 2015.

#### **Trabalho já aceito, ainda a apresentar:**

MARTINS, S. R. S.; SANTOS, A.; BARBOSA, A. S.; FRIKS, A. T.; SOARES, C. M.; CABRERA-PADILLA, R. Y. **Imobilização de lipase de *burkholderia cepacia* em suportes híbridos sob influência de líquidos iônicos próticos.** In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química e XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química, 2016.