UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGANHARIA DE PROCESSOS - PEP

TECIDO DE SÍLICA COMO UMA NOVA MATRIZ PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM BIODIESEL

Autor: Islânia dos Santos Lima
Orientadores: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima
Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira

ARACAJU, SE – BRASIL
JULHO DE 2015

TECIDO DE SÍLICA COMO UMA NOVA MATRIZ PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM BIODIESEL

Islânia dos Santos Lima

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:

Dr. Álvaro Silva Lima

Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira

Dra. Cleide Mara Faria Soares

Dr. Felipe Korbus Sutili

ARACAJU, SE – BRASIL
JULHO DE 2015

L732t Lima, Islânia dos Santos

Tecido de sílica como uma nova matriz para imobilização de lipases e aplicação em biodiesel / Islânia dos Santos Lima ; orientação [de] Prof. Dr. Álvaro Silva Lima, Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira. – Aracaju: UNIT, 2015.

71 p. il.:

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, 2015

Inclui bibliografia

1. Tecido de sílica. 2. Imobilização-lipase. 3. Método de imobilização ADS/LC. 4. Conversão-ésteres etílicos. I. Lima, Álvaro Silva. (orient.). II. Ferreira, Luiz Fernando Romanholo. (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 577.1

Ficha catalográfica: Rosangela Soares de Jesus CRB/5 1701

"Existem duas escolha primordiais na vida:
aceitar as condições como elas existem, ou aceitar a
responsabilidade de mudá-las."

(Denis Waitley)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por iluminar sempre o meu caminho e me proporcionar condições necessárias para que eu tenha força e coragem para vencer os desafios a cada dia.

Aos meus pais, por me apoiarem sempre e por acreditarem em mim. À minha mãe, uma mulher guerreira a quem eu devo tudo que sou hoje, sempre esteve ao meu lado, me incentivando, a senhora é meu maior exemplo.

Aos meus irmãos por permanecerem sempre ao meu lado, por todo amor e carinho. Vocês são os presentes que Deus me deu. À princesinha mais linda da tia, Loren, você é a felicidade constante dos meus dias. À minha tia Bia por todo amor e cuidados dedicados a mim.

Ao Felipe por todo amor, incentivo, carinho, paciência. Obrigada por todos os momentos felizes, por sempre me apoiar e me dar força quando eu preciso.

Aos meus familiares, tias, tios, primas e primos, e meus amigos, por sempre torcerem por mim e por proporcionarem momentos alegres e renovadores.

Aos meus orientadores Álvaro Silva Lima e Luiz Fernando R. Ferreira que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade, dedicação, amizade, paciência, incentivo e oportunidades.

À professora Eliane Bezerra Cavalcanti pelos ensinamentos, atenção e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários da Universidade Tiradentes e do Instituto de Tecnologia e Pesquisa, que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade de Aveiro pelas análises das amostras deste trabalho.

Ao aluno de iniciação científica Mateus Batista que me acompanhou durante a execução dos experimentos, obrigada.

Aos amigos do laboratório que sempre estiveram dispostos a tirar minhas dúvidas, me ajudando nos experimentos, pelas palavras de incentivo, carinho e pelos momentos de descontrações. Obrigada por tudo.

A CAPES, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento deste 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.

TECIDO DE SÍLICA COMO UMA NOVA MATRIZ PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM BIODIESEL

Islânia dos Santos Lima

Este trabalho teve como objetivo aplicar o tecido de sílica como suporte na imobilização da Lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) através dos métodos de imobilização por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC). Avaliou-se o rendimento de imobilização (RI) em diferentes concentrações de enzima, dentre os métodos testados, obteve-se o máximo 80 % e 27 %, com a carga enzimática de 0,1 $g_{enzima}/g_{suporte}$, para a ligação covalente (LC) e adsorção física (ADS), respectivamente. Deste modo, foi selecionado o método por LC para o estudo das propriedades bioquímicas, caracterização físico-química e morfológica, já que o método por ADS apresentou menor RI. A partir do estudo das propriedades bioquímicas observou-se o pH ótimo 7,0 para a lipase de BC livre e imobilizada, confirmando que a imobilização não alterou o pH ótimo da enzima. A temperatura ótima para o biocatalisador imobilizado foi 60 °C, 10 °C acima da temperatura ótima da enzima livre. Em relação à estabilidade térmica, o biocatalisador imobilizado exibiu ótima resistência à temperatura, que proporcionou um aumento da estabilidade térmica de 7 vezes (4,6 h para 33,7 h). A lipase imobilizada pode ser reutilizada por 3 vezes, considerando a manutenção de 60 % de sua atividade inicial. Na reação de transesterificação com óleo de coco e etanol, foram obtidos os seguintes resultados: 47,31 % de conversão de ésteres etílicos com o tempo de 96 h a 40 °C. Com objetivo de determinar as características químicas e morfológicas do tecido de sílica e do biocatalisador imobilizado foi realizado Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios-X (DRX), Análise Termogravimétrica (TG), BET, Medida do ângulo de contato e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada à espectroscopia de dispersão de energia (EDS).

Palavras-chave: Tecido de sílica, lipase, imobilização.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.).

SILICA CLOTH AS A NEW MATRIX FOR LIPASE IMMOBILIZATION AND BIODIESEL GENERAL APPLICATION

Islânia dos Santos Lima

This paper aimed to apply the silica fabric as support for lipase immobilization of *Burkholderia cepacia* (BC) through physical adsorption and covalent bond methods. We evaluated the immobilization yield at different enzyme concentrations, among tested methods, there was obtained the maximum 80 % and 27 %, with the enzyme load of 0.1 $g_{enzima}/g_{suporte}$ for covalent binding and physical adsorption, respectively. Thus, it was selected the covalent binding method for the study of biochemical properties and physical-chemical and morphological characterization, as the physical adsorption method was inefficient. From the study of the biochemical properties it was observed an optimum pH 7.0 for free and immobilized covalent binding lipase, confirming that immobilization did not change the optimal pH of the enzyme. The optimum temperature for the immobilized biocatalyst was 60 ºC, 10 ºC higher than free enzyme optimum temperature, which resulted in a thermal stability increase of 7 times (4,6 h to 33,7 h). The immobilized lipase can be reused 3 times, considering the maintenance of 60 % of its initial activity. In the transesterification reaction with coconut oil and ethanol, it was obtained the following results: ethylic ester conversion of 47.31 % with a time of 96 h at 40 ºC. With the purpose to characterize physical-chemically and morphologically the silica cloth and the immobilized biocatalyst it was conducted Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), Thermogravimetric analysis, BET, Contact angle measurement, Scanning Electron Microscopy (SEM) coupled with an energy dispersive spectroscopy (EDS).

Keywords: Silica cloth, lipase, immobilization.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **1**

CAPÍTULO I **3**

1. OBJETIVOS **3**
1.1. OBJETIVO GERAL 3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3

CAPÍTULO II **4**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **4**
2.1. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES 4
2.1.1. Lipases 6
2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS 10
2.2.1. Métodos de imobilização 11
2.2.2. Suportes para imobilização 14
2.2.3. Métodos de Imobilização em Suportes de Tecidos 18
2.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL 20
2.3.1. Biodiesel 20
2.3.2. Matérias-primas para a produção de biodiesel 21
2.3.2.1. Óleo de coco 22
2.3.3. Reação de transesterificação 23

CAPÍTULO III **25**

ARTIGO **25**
RESUMO 26
1. INTRODUÇÃO 27
2. MATERIAIS E MÉTODOS 28
2.1. Materiais e reagentes 28
2.2. Imobilização da lipase em tecido de sílica 29
2.3. Determinação da Atividade Hidrolítica 30
2.4. Caracterização bioquímica da lipase livre e imobilizada 30
2.4.1. Efeito do pH e da Temperatura na Atividade Hidrolítica 30
2.4.2. Estabilidade térmica e operacional 31
2.4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos 31
2.5. Reação de transesterificação enzimática 31
2.6. Propriedades morfológicas e físico-químicas 32
2.6.1. Brunauer–Emmett–Teller (BET) 32
2.6.2. Medida do ânuglo de contato 32
2.6.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 33
2.6.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 33
2.6.5. Difratometria de raio-X (DRX) 33

2.6.6. Análise Termogravimétrica (TG) 33
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES 34
3.1. Imobilização da lipase 34
3.2. Efeito do pH e Temperatura 35
3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos 37
3.4. Estabilidade Térmica 38
3.5. Estabilidade Operacional 40
3.6. Reação de Transesterificação 41
3.7. Propriedades morfológicas e físico-químicas 42
3.7.1. Brunauer – Emmett – Teller (BET) 42
3.7.2. Medida do ângulo de Contato 43
3.7.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 44
3.7.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 45
3.7.5. Difração de raios X (DRX) 46
3.7.6. Análise Termogravimétrica (TG) 46
4. CONCLUSÕES 47
REFERÊNCIAS 48

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES 52

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 53

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A abertura por setor do mercado mundial das enzimas em 2010 por setor (Adaptada de DICOSIMO *et al*., 2013). 6
Figura 2. Reações catalisadas por lipases (PAQUES E MACEDO *et al*., 2006). 7
Figura 3. Ativação interfacial de lipases (PALOMO *et al*., 2006). 8
Figura 4. Representação da estrutura da Lipase de *Burkholderia cepacia*. A tampa da estrutura cristalina aberta da LBC está representada de cor azul e modelo fechado de cor verde e a esfera do íon Ca^{2+} de cor amarela. A tríade catalítica que consiste em Serina, Histidina e Aspartato (SCHRAG *et al*., 1997). 9
Figura 5. Método de imobilização por adsorção (ENALSHAR, 2010). 11
Figura 6. Método de imobilização por ligação covalente com braço espaçador (ELNASHAR 2010). 13
Figura 7. Fatores que afetam o desempenho de enzimas imobilizadas em suportes sólidos (Adaptado de CARVALHO *et al*., 2014). 14
Figura 8. As duas estratégias de tratamento: representação esquemática do tecido de seda exibindo o envolvimento de grupos funcionais NH_2 e COOH: (a) adsorção física e (b) ligação covalente com glutaraldeído (Adaptado de LI *et al*., 2014). 18
Figura 9. O procedimento e os mecanismos propostos para a imobilização da lipase PEI multicamadas em fibrilas de tecido de algodão (Adaptado ONDUL *et al*., 2012). 19
Figura 10. Transesterificação de triglicerídeos com álcool (ABBASZAADEH *et al*., 2012). 23
Figura 11. Rendimento de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) em função das diferentes razões enzima/suporte à temperatura de 37 °C. 34
Figura 12. Efeito do pH na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por ligação covalente (LC) à temperatura de 37 °C. 36
Figura 13. Efeito da temperatura na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por ligação covalente (LC). 37
Figura 14. Estabilidade térmica da lipase de BC livre e imobilizada por ligação covalente (LC) incubada a 60 ºC. 39
Figura 15. Estabilidade operacional da lipase imobilizada por ligação covalente (LC) em tecido de sílica (T = 60 °C; pH 7,0; tempo de reação: 10 min). 40
Figura 16. Influência do tempo de reação na conversão de ésteres etílicos (T = 40 °C, razão molar óleo:etanol = 1:7). 42
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura: (a), (b) e (c) tecido de sílica e (d), (e) e (f) biocatalisador imobilizado por LC. 44
Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado à espectroscopia de dispersão de energia (EDS): (a) tecido de sílica e (b) biocatalisador imobilizado por LC. 45
Figura 19. Espectro de FTIR para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC. 45
Figura 20. Difratograma de raios X para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC. 46
Figura 21. Curvas termogravimétricas do tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas com base no tipo de reação química catalisada (TORTORA *et al*., 2008). 5
Tabela 2. Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas (Modificada de CARVALHO *et al*., 2014)..... 16
Tabela 3. Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da enzima livre e imobilizada. 38
Tabela 4. Valores da constante de inativação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{(1/2)}$) para a lipase de BC livre e imobilizada por LC a 60 °C. 39
Tabela 5. Área superficial específica, volume e diâmetro dos poros para o tecido de sílica (TS) e biocatalisador imobilizado (BI) por LC. 43
Tabela 6. Medida do ângulo de contato para a superfície do tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC. 44

INTRODUÇÃO

O processo de imobilização enzimática tem se tornado uma opção cada vez mais atrativa para o emprego em diversos tipos de reações, em função das exigências atuais por processos industriais sustentáveis que considerem os princípios da química verde. O uso de catalisadores enzimáticos é mais favorável ao meio ambiente em comparação com os catalisadores químicos, pois requer menos energia, elimina os problemas de separação, permite a recuperação do catalisador e as condições de funcionamento são mais leves (BRUNSCHWIG *et al*., 2012).

Diante deste contexto, a utilização de enzimas já foi bastante estudada como catalisadores em diversos processos industriais, principalmente na indústria alimentícia, química, farmacêutica, entre outras. Uma das principais enzimas utilizadas industrialmente são as lipases, que hidrolisam óleos e gorduras na interface orgânico-aquosa, o que as tornam catalisadores enzimáticos empregados em vários processos, como: transesterificação, esterificação, acidólise, hidrólise, dentre outros. Porém, a utilização de enzimas na sua forma solúvel para processos industriais de grande escala é limitada devido a alguns fatores como o alto custo de produção, a baixa estabilidade operacional, impossibilidade de reutilização, dificuldade na separação da mistura dos reagentes, a contaminação do produto, entre outros (ZARCULA *et al*., 2009).

Com o objetivo minimizar estas barreiras, as lipases foram imobilizadas por diversas técnicas, o que permite melhoramento da eficiência catalítica da enzima, maior facilidade de separação dos produtos do meio reacional, maior estabilidade operacional, além de permitir a reciclagem do biocatalisador (ZHANG *et al*., 2012). Desta forma, as técnicas de imobilização de enzimas visam à estabilização da lipase e a redução do custo, com a finalidade de tornar os processos enzimáticos industrialmente viáveis.

Na busca da eficiência do método de imobilização de enzimas ainda tem-se a necessidade do desenvolvimento de novos suportes, principalmente de baixo custo, e avaliação de métodos de imobilização que conservem a atividade catalítica da enzima após a obtenção do sistema imobilizado e apresentem potencialidade para aplicações comerciais. Diante disso, muitos estudos já foram descritos na literatura com o objetivo de aperfeiçoar o sistema imobilizado (enzima-suporte) levando em consideração o custo-benefício, no qual o suporte é um dos grandes alvos.

Deste modo, diversos suportes já foram propostos na literatura para a imobilização de lipases, como a utilização de sílicas (BARBOSA *et al*., 2014; SOUZA

et al., 2014; CANILHO *et al*., 2013; HU *et al*., 2012), alguns tipos de tecidos, tais como seda (LI *et al* 2014; CHEN *et al*., 2012), algodão (ONDUL *et al*., 2012; SHU *et al*., 2011) e lã (FENG *et al*., 2013). Entretanto, até o presente momento ainda não foi verificado o uso de tecido de sílica como suporte para a imobilização, evidenciando a originalidade deste estudo para o desenvolvimento de sistemas imobilizados.

Neste contexto, o presente trabalho vem contribuir com uma alternativa de biocatalisador, visando à aplicação na reação de transesterificação enzimática para a produção de ésteres etílicos (biodiesel).

CAPÍTULO I

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é propor o tecido de sílica como um novo suporte para imobilização da Lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) por meio de processos por adsorção física e ligação covalente.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) em tecido de sílica pelas técnicas de adsorção física e ligação covalente;

- Determinar o carregamento ótimo para o sistema imobilizado (lipase-tecido de sílica);

- Realizar a caracterização bioquímica do biocatalisador imobilizado;

- Estudar a viabilidade do sistema imobilizado (estabilidade operacional);

- Avaliar o potencial de aplicação dos biocatalisadores (BIs) em reações de transesterificação;

- Caracterizar o tecido de sílica e o biocatalisador imobilizado quanto ao volume e distribuição do tamanho de poros, área superficial (método B.E.T); hidrofobicidade (medida do ângulo de contato), microscopia eletrônica de varredura (MEV); composição química em espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); difratometria de raio-X (DRX); e análise termogravimétrica (TG).

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica apresenta uma breve abordagem dos temas relacionados para o desenvolvimento deste trabalho, iniciando-se pela conceituação de enzimas com enfoque nas lipases, imobilização das enzimas, métodos de imobilização, suportes empregados na imobilização, métodos de imobilização em tecidos e aplicação das lipases imobilizadas na síntese de biodiesel.

2.1. ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, nas quais exercem a função de biocatalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular e apresentam funções vitais de controle dos processos de transformação dos nutrientes em energia e material celular (BON *et al*., 2008). Esses biocatalisadores têm se destacado devido às suas características naturais sobre os catalisadores químicos convencionais, como a eficiência elevada, especificidade e seletividade, atuando em condições suaves de temperatura, pressão e pH. Este comportamento permite uma redução no custo final do processo e evita a formação de subprodutos indesejáveis (MENDES *et al*., 2011; FENG *et al*., 2013).

Em muitos processos as enzimas podem substituir compostos químicos sintéticos e contribuir para processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia. Devido a sua elevada especificidade, pode ser atingido maior rendimento do processo, e permite a obtenção de produtos biodegradáveis, reduzindo a quantidade de resíduos gerados. (LEHNINGER *et al*., 2011; MENDES *et al*., 2011).

Neste contexto, as enzimas se tornaram excelentes catalisadores em diversas áreas da indústria química, como química fina, química dos alimentos, e análise (GUISAN, 2006).

Porém, devido a alguns fatores limitativos como a instabilidade sob condições operacionais, a dificuldade de recuperação da enzima e a complexidade dos procedimentos de separação do produto a partir de enzimas livres, existem apenas

algumas aplicações de enzimas na indústria. Sendo assim, há um enorme interesse em métodos que tentam desenvolver biocatalisadores competitivos para aplicações industriais, através de melhoria das suas propriedades catalíticas, como atividade, estabilidade, pH, faixa de temperaturas e capacidade de reutilização (FENG *et al*., 2013; VILLENEUVE, 2000).

Tal melhoria bem sucedida de propriedades de enzimas deve ser uma das principais soluções para o desenvolvimento de uma indústria química muito mais sustentável que seja capaz de sintetizar compostos muito complexos e úteis em condições muito suaves e de baixo custo (GUISAN, 2006).

Segundo TORTORA *et al*. (2008) as enzimas podem ser agrupadas em 6 classes, de acordo com o tipo de reação química que elas catalisam, como mostra a Tabela 1.

O mercado mundial de enzimas industriais ultrapassou $ 3.3 bilhões em 2010 e deverá crescer para cerca de $ 4,5 a $ 5 bilhões até 2015, uma taxa de crescimento anual composta de 7-9 %. Este mercado é dominado por produtos contendo enzimas, predominantemente hidrolases (por exemplo, amilases, celulases, proteases e lipases) (DICOSIMO *et al*., 2013). Os segmentos de mercado para as enzimas são mostrados na Figura 1.

Tabela 1. Classificação das enzimas com base no tipo de reação química catalisada (TORTORA *et al*., 2008).

Classe	**Tipo de reação química catalisada**	**Exemplos**
Oxidorredutaes	Oxidação-redução em que oxigênio e hidrogênio são ganhos ou perdidos	Citocromo, oxidase, lactato desidrogenase
Transferases	Transferência de grupos funcionais, tais como um grupo amino, grupo acetil ou grupo fosfato	Acetato quinase, alanina deaminase
Hidrolases	Hidrólise (transferência de grupos funcionais da água)	Lipase, sacarase
Liases	Remoção de grupos de átomos sem hidrólise	Oxalato descarboxilase, isocitrato liase
Isomerases	Rearranjo de átomos dentro de uma molécula	Glicose-fosfato isomerase, alanina racemase
Ligases	União de duas moléculas (usando energia geralmente derivada da quebra do ATP)	Acetil-CoA sintetase, DNA ligase

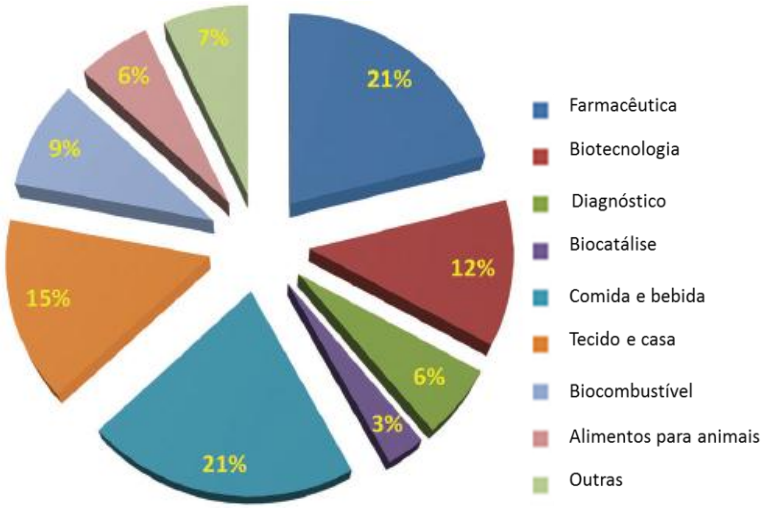

Figura 1. A abertura por setor do mercado mundial das enzimas em 2010 por setor (Adaptada de DICOSIMO *et al*., 2013).

As lipases são a classe de enzimas mais amplamente utilizadas na síntese orgânica por apresentarem algumas vantagens como a disponibilidade de um grande número de preparações comerciais e a sua ampla especificidade e estabilidade relativamente melhor em meios contendo solventes orgânicos (KAPOOR E GUPTA, 2012).

2.1.1. Lipases

Lipases são hidrolases de éster de triacilglicerol (EC 3.1.1.3), que catalisam a quebra de gorduras e óleos com subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. As lipases também podem ser aplicadas como catalisadores de diversas reações como hidrólise, esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise,) e aminólise (síntese de amidas) em solventes orgânicos, como mostra a Figura 2 (VILLENEUVE *et al*., 2000; KAPOOR E GUPTA, 2012; DONG *et al.*, 2012).

Grande atenção é dada ao uso comercial de lipases, tornando-as uma alternativa ambiental e economicamente viável aos catalisadores químicos convencionais, pois permitem catalisar reações com produtos secundários reduzidos, diminuindo os custos de tratamento de resíduos e podendo atuar sob condições de temperatura e de pressão moderada (VILLENEUVE *et al*., 2000; SCHMID *et al*., 2001).

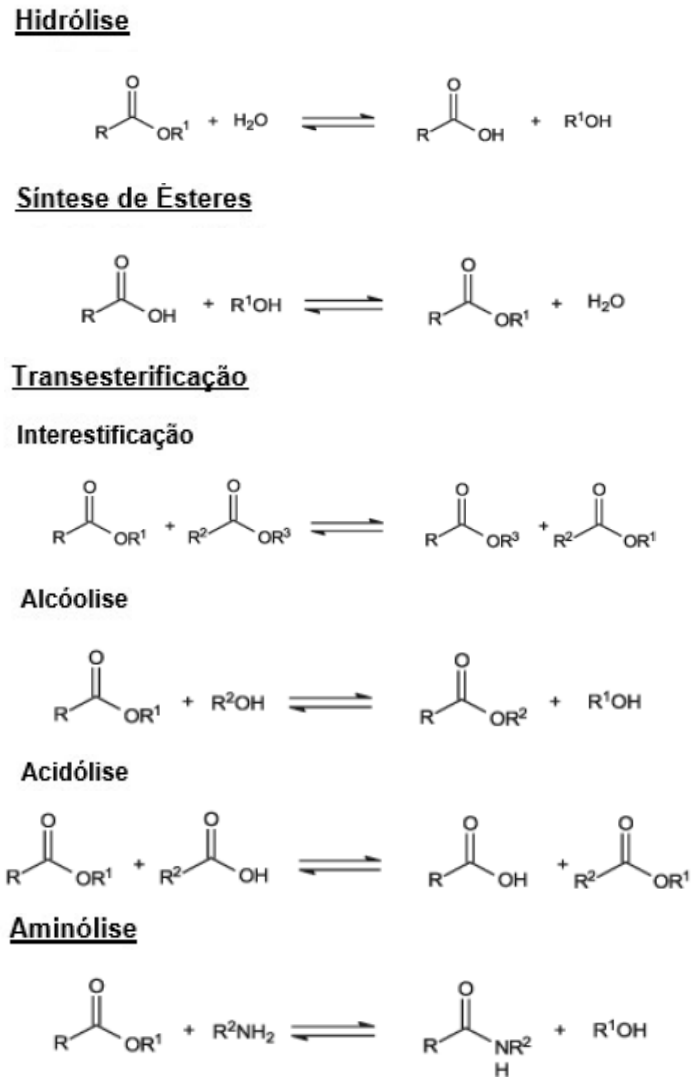

Figura 2. Reações catalisadas por lipases (PAQUES E MACEDO *et al*., 2006).

As lipases apresentam um mecanismo catalítico muito complexo, como por exemplo, a lipase de *Burkholderia cepacia*, que em soluções aquosas homogêneas está numa conformação fechada e inativa, na qual o sítio ativo está completamente isolado do meio reacional através de uma cadeia oligopeptídica chamada de "flap", "lid" ou "tampa", que bloqueia a entrada do substrato até o sítio ativo. Esta cadeia polipeptídica apresenta vários resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na sua face interna, que interagem com as regiões hidrofóbicas ao redor do sítio ativo. Esta conformação pode existir em um equilíbrio parcial com a conformação aberta e ativa, em que a tampa abre e se estabiliza por interações iônicas ou ligações ponte de hidrogênio com uma parte específica da superfície da enzima, permitindo o acesso do substrato ao sítio ativo (PALOMO *et al*., 2006). O mecanismo descrito acima é mostrado na Figura 3.

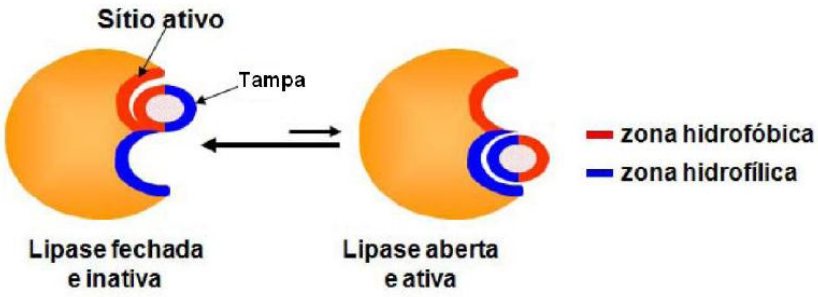

Figura 3. Ativação interfacial de lipases (PALOMO *et al*., 2006).

As lipases podem ser produzidas a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas. Suas preparações comerciais são derivadas principalmente de fontes microbianas devido ao baixo custo de produção e fácil modificação de suas propriedades (ANTCZAK *et al*., 2009).

A depender da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. São usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C. Entretanto, sua termoestabilidade varia em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al*., 2004).

As enzimas a partir de micro-organismos possuem menor tempo de geração, elevado rendimento de produto, condições de cultura mais simples e suas potenciais aplicações em diversas indústrias, tais como alimentos, farmacêutica, detergentes, têxtil, bidiesel, cosméticos. A razão para o enorme potencial biotecnológico de lipases microbianas é que eles são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de co-fatores, possuem ampla especificidade de substrato e também apresentam uma alta enantioseletividade (NARWAL E GUPTA, 2013).

As lipases podem ser produzidas por diversos micro-organismos como as bactérias: *Bacillus* sp, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, fungos: *Candida rugosa*, *Candida antártica*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor*, *Geotrichum* sp. (BON *et al*., 2008).

Uma das lipases mais versáteis é a obtida por *Burkholderia cepacia* e o que as torna mais atraentes é que elas possuem grande estabilidade em solventes orgânicos e um alto grau de enantioseletividade. Esta lipase é constituída por uma cadeia polipeptídica de massa molar com aproximadamente 33 kDa e possui 320 resíduos de

aminoácidos, apresentando características de alta estabilidade e atividade (HARA *et al*., 2008).

A estrutura da lipase *Burkholderia cepacia* está descrita na Figura 4, a qual exibe uma estrutura cristalina e outras características como a presença de um sítio de cálcio que, estabiliza a tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos da serina, histidina e aspartato. Este pode ser um importante sítio para forçar a permanência de algumas ligações peptídicas, que pode beneficiar a proteína na manutenção de algumas ligações de hidrogênio (SCHRAG *et al*., 1997).

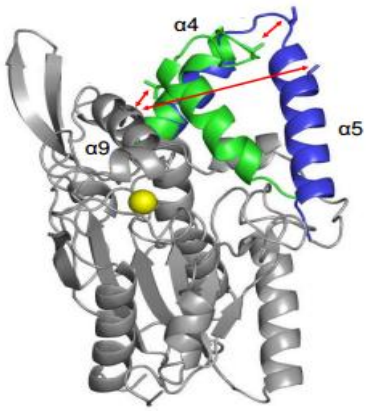

Figura 4. Representação da estrutura da Lipase de *Burkholderia cepacia*. A tampa da estrutura cristalina aberta da LBC está representada de cor azul e modelo fechado de cor verde e a esfera do íon Ca^{2+} de cor amarela. A tríade catalítica que consiste em Serina, Histidina e Aspartato (SCHRAG *et al*., 1997).

Embora apresentem excelentes propriedades catalíticas, as enzimas necessitam de melhorias antes da sua aplicação em escala industrial, pois sua utilização na forma solúvel para processos industriais de grande escala é limitada pelo seu alto custo de produção e estabilidade. Enzimas solúveis podem inativar, devido ao efeito do solvente e dos choques mecânicos, o que pode conduzir à desnaturação e a perda de sua atividade, além da impossibilidade de recuperação e reutilização deste biocatalisador. Por isso, alguns estudos já foram propostos para estabilizar a atividade enzimática e aumentar a estabilidade operacional, por meio de técnicas de imobilização com o objetivo de reutilizar as enzimas (MATEO *et al*, 2007; MENDES *et al*., 2012; CARVALHO *et al*., 2014).

2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas imobilizadas referem-se às “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região definida do espaço com a retenção da sua atividade catalítica, e que pode ser usada repetidamente e de forma contínua” (GUISAN *et al.*, 2006).

A imobilização tem o objetivo de melhorar a estabilidade e capacidade de reutilização do biocatalisador em comparação com a enzima livre, uma vez que as enzimas são solúveis em água e, portanto, tornam-se difíceis de serem recuperadas deste meio (SHELDON E PELT, 2013). Deste modo, a reutilização do biocatalisador é indispensável para tornar viável um processo econômico.

Para a obtenção da diminuição no custo global de processos que utilizam enzimas imobilizadas, o procedimento de imobilização deve atender a alguns requisitos, como baixo custo, boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (BON *et al*., 2008)

Deve-se considerar que um dos objetivos da imobilização é a estabilização da enzima, pois sua reutilização só é possível se a atividade for mantida durante vários ciclos de reações. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior a enzima livre. Assim, o processo de imobilização não deve acarretar em alterações estruturais prejudiciais à atividade catalítica (DALLA-VECCHIA, 2004; GALAN *et al*., 2011).

Um sistema de imobilização adequada deve proporcionar uma imobilização suficientemente forte para evitar a liberação da enzima que pode contaminar o produto e resultar em perda de enzima e atividade catalítica (LI *et al*., 2014). Deste modo, para uma escolha do método de imobilização deve-se levar em consideração a seleção do suporte, o rendimento de imobilização e análise superficial dos biocatalisadores imobilizados (CARVALHO *et al*., 2014).

As principais vantagens da imobilização são o aumento da estabilidade térmica e a resistência às condições extremas e reagentes químicos, atividade estável em uma ampla faixa de temperatura e pH, as enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas dos produtos, permitindo que as enzimas possam ser empregadas nas diversas operações industriais, além de diminuir o custo de produção por seu potencial de reutilização, o que é uma condição necessária para torná-los mais atraentes e potentes para aplicações industriais (FERNÁNDEZ *et al*., 2013; NARWAL E GUPTA, 2013).

Diante disso, a imobilização é uma alternativa promissora para aplicação industrial, na qual as propriedades do suporte e os métodos de imobilização podem influenciar significativamente a atividade da enzima imobilizada (FENG *et al*., 2013).

2.2.1. Métodos de imobilização

O suporte e os principais métodos de imobilização são parâmetros essenciais na imobilização de enzimas. A escolha de uma técnica de imobilização está baseada no custo do processo, na atividade enzimática global, na eficácia da utilização da lipase e as características desejadas para o biocatalisador imobilizado (ZHANG *et al*., 2012).

Apesar da grande diversidade de métodos de imobilização existentes, não há um método aplicável para todas as enzimas. Isto porque existem diferenças relacionadas às características e composição química das enzimas, diferentes propriedades de substrato e produto e à finalidade de aplicação ao produto obtido (VILLENEUVE *et al*., 2000).

A enzima pode ser ligada ao suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz e a classificação do método de imobilização pode ser considerada quanto ao tipo de interação responsável pela ligação da enzima no suporte, como meios químicos ou físicos (CARVALHO *et al*., 2014).

Segundo Feng *et al*. (2013) vários métodos foram relatados para a imobilização da lipase em diferentes suportes, os quais são divididos em três categorias: adsorção sobre o suporte, ligação covalente sobre o suporte e encapsulamento.

A adsorção física é um dos métodos mais simples. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (Figura 5) (MENDES *et al*., 2012). As principais vantagens deste método de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo, baixo custo e a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada (MENDES *et al*., 2012).

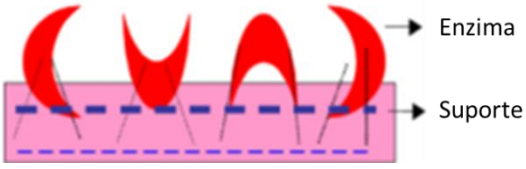

Figura 5. Método de imobilização por adsorção (ENALSHAR, 2010).

Uma das desvantagens do método de adsorção é que as enzimas são dependentes das condições do pH, temperatura, substrato e solvente, com isso elas podem ser dessorvidas com qualquer desses parâmetros, como também durante a lavagem e outras etapas do processo. Assim, a imobilização por meio do método de adsorção requer uma interação eletrostática entre o suporte e a enzima para que a mesma não se dessorva do mesmo durante a lavagem e outras etapas do processo (KHARRAT *et al*., 2011; MENDES *et al*., 2011).

A eficiência de imobilização da enzima por adsorção, também está relacionada com o suporte empregado. Nesse sentido, vários suportes podem ser utilizados e a escolha de um deles depende de suas propriedades como resistência mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (DALLA-VECCHIA *et al*., 2004; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al*., 2013).

A ligação covalente, ilustrada na Figura 6, é uma técnica de imobilização de enzima que envolve a modificação na superfície do suporte com agentes bifuncionais para imobilização eficiente e irreversível da enzima. Os agentes bifuncionais promovem uma forte ligação entre o suporte e os grupamentos presentes na enzima, permitindo uma flexibilidade conformacional mais ampla. Dentre estes agentes, os mais utilizados são 3-aminopropiltrietoxissilano, 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloridrina e glutaraldeído (CARVALHO *et al*., 2014).

Este método baseia-se na ativação do suporte com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Devido à forte interação entre a lipase e o suporte, é considerado um método bastante estável, evitando assim a liberação da lipase a partir do suporte (ELNASHAR, 2010).

Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização. Porém, apresenta como desvantagem a facilidade em alterar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do sítio ativo (MENDES *et al*., 2011).

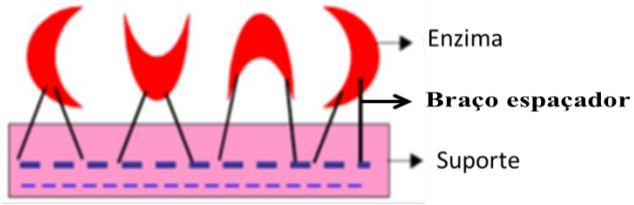

Figura 6. Método de imobilização por ligação covalente com braço espaçador (ELNASHAR 2010).

Imobilização por ligação covalente é um dos métodos de imobilização mais importantes que podem melhorar a estabilidade da enzima além de permitir uma fácil recuperação e reutilização da mesma. Porém, este método pode resultar em perdas da atividade enzimática. Há três razões principais para que isso ocorra: o impedimento estérico, que bloqueia parcialmente a ligação com os sítios ativos; limitações na difusão, reduzindo a conversão e mudanças estruturais, que podem ocorrer durante o período do processo de imobilização (ZHU *et al*., 2011).

No entanto, apesar desses fatores resultarem em perda da atividade, enzimas imobilizadas com uma atividade de aproximadamente a mesma que a enzima livre tem o potencial para ser utilizado na indústria. Os custos economizados pela recuperação e reutilização das enzimas pode compensar a perda de atividade (MILÉTIC *et al*., 2012).

Os suportes utilizados na ligação covalente podem ser inorgânicos, polímeros naturais ou sintéticos e, são escolhidos através de suas propriedades como: solubilidade, grupos funcionais, estabilidade mecânica, área superficial, e sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica (MATEO *et al*., 2007).

A imobilização por reticulação ou cross-linking é desenvolvida com ausência de suporte, em que enzimas se ligam umas às outras sem precisar recorrer a um suporte. O procedimento é realizado por meio da ligação cruzada que ocorre por meio da reação do grupamento amino da superfície da enzima com um reagente bifuncional, como por exemplo, o glutaraldeído (MILETIC *et al*., 2012).

Outra técnica de imobilização de enzimas consiste na encapsulação, que é o aprisionamento por meio da inclusão, o que significa que a enzima está encapsulada em uma rede de polímero, tal como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. O aprisionamento protege as enzimas, impedindo o contato direto com o meio ambiente através da retenção das enzimas no interior de um material, mas tem a desvantagem das limitações de transferência de massa e a possibilidade da enzima inativar durante a imobilização (MILETIC *et al*., 2012).

Apesar de apresentarem vantagens e desvantagens, a escolha do método de imobilização e de modificação do suporte deverá considerar as relações entre suporte, enzima e substrato, parâmetros físicos (temperatura e pressão), solventes, água para manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional das lipases e o tipo de reator (CARVALHO *et al*., 2014).

2.2.2. Suportes para imobilização

As propriedades das preparações de enzimas imobilizadas são influenciadas pelas características da enzima e do material do suporte. Portanto, a interação entre o suporte e a enzima proporcionará ao biocatalisador imobilizado as suas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas, como mostra a Figura 7.

A escolha do suporte é um fator importante que influencia na reação enzimática. Estudos comparativos indicaram que a mesma molécula de lipase podem apresentar diferentes propriedades catalíticas após imobilização em diferentes suportes (DA RÓS *et al*., 2010).

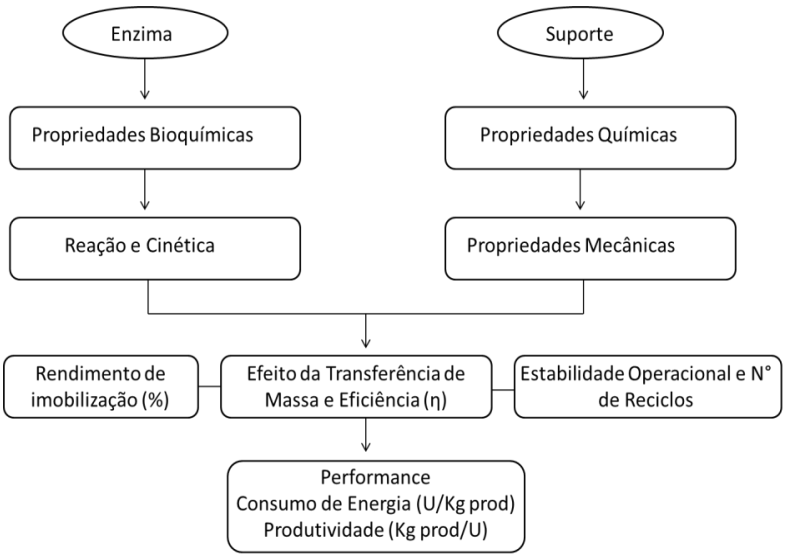

Figura 7. Fatores que afetam o desempenho de enzimas imobilizadas em suportes sólidos (Adaptado de CARVALHO *et al*., 2014).

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Portanto, na seleção de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas algumas características, as quais irão determinar a aplicabilidade do biocatalisador, tais como suas propriedades físicas e químicas, estabilidade térmica e química, resistência mecânica e microbiana, resistência física à compressão, natureza

hidrofílica ou hidrofóbica, morfologia e composição, a capacidade de regeneração, a capacidade de carregamento da enzima, seu custo e área superficial. Ainda se deve considerar o custo-benefício, pois o preço do suporte utilizado na imobilização de enzimas é um fator a ser analisado, devendo ser comparadas as vantagens e desvantagens da aplicação dos biocatalisadores nos diferentes processos (GUISAN, 2006; JEGANNATHAN, 2010; GUPTA, 2013).

Uma das características mais importantes do suporte é a sua morfologia, que vai determinar a interação com a enzima. Se o material de suporte é altamente poroso, o tamanho e a distribuição dos poros irão desempenhar um papel importante na determinação das propriedades de enzimas imobilizadas. Um tamanho de poro pequeno pode causar limitação de difusão resultante num rearranjo estrutural das enzimas e inatividade subsequente. No entanto, para tamanhos de poros muito grandes, as enzimas podem se agrupar e, assim, perder atividade (MILETIC *et al*., 2012)

Contudo, a escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá de dois fatores: das características da lipase e das condições de uso do sistema imobilizado. Essas características são de extrema importância no desempenho das lipases imobilizadas (CARVALHO *et al*., 2006).

Conforme descrito na literatura, há uma imensa variedade de suportes que têm sido utilizados para imobilização de enzimas, e de modo geral, podem ser classificados de acordo com sua natureza química, em suportes orgânicos e inorgânicos, que são apresentados na Tabela 2, na qual mostra a classificação de diferentes suportes para imobilização de lipases.

Os suportes inorgânicos são mais apropriados para o uso industrial por apresentar elevada resistência mecânica, boa estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano, sendo estáveis em uma ampla faixa de pressões, temperaturas e pH, e geralmente obtém maior estabilidade do que suportes orgânicos, devido à maior inércia para as condições de reação como a elevada pressão e temperatura (DE CASTRO *et al*., 2008; MILETIC *et al*., 2012).

Dentre os materiais inorgânicos descritos na literatura destaca-se a sílica (SiO_2), que já é considerado um elevado potencial de aplicação para imobilização, principalmente devido à possibilidade de modificação de sua superfície, além de estabilidade térmica e mecânica. A sílica pode ser classificada como natural ou sintética, micro, meso ou macroporosa e pode ser adquirida comercialmente ou também ser produzida, por diferentes técnicas (CARVALHO *et al*., 2014).

Tabela 2. Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas (Modificada de CARVALHO *et al*., 2014).

Natureza	Classificação do suporte	Suporte	Lipase	Referência
Natural	Orgânico	Fibra de coco	Laccase comercial	Cristóvão *et al*., 2011
		Quitosana	*Candida antártica B*	Silva *et al*., 2012
		Bagaço da cana-de-açucar	*Thermomyces lanuginosus*	Mendes *et al*., 2013
	Inorgânico	Sílica	*Burkholderia cepacia*	Barbosa *et al*., 2014
		Nonofibra	*Pseudomonas cepacia*	Li *et al*., 2011
Sintético	Orgânico	PHBV	*Candida rugosa*	Cabrera-Padilla *et al*., 2011
		Poliestireno	Pâncreas suíno	Hou *et al*., 2014
	Inorgânico	Sílica	*Burkholderia cepacia*	Souza *et al*., 2014
		Nanopartículas de Fe_3O_4	*Thermomyces lanuginosus*	Wang *et al*., 2015
		Alumina	*Bacillus sp.*	Kumar *et al*., 2013
	Híbrido (orgânico e inorgânico)	SiO_2-quitosana	Candida rugosa	Simões *et al*., 2011

PHBV = Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);

Na literatura há vários trabalhos utilizando a sílica em suas várias formas e modificações superficiais. Essas modificações se baseiam na utilização de aditivos e/ou agentes bifuncionais e têm como intuito proporcionar maior eficiência catalítica devido à minimização dos efeitos difusionais de substratos e produtos durante a reação, além da melhoria da estabilidade operacional. Alguns aditivos mais comuns são polietilenoglicol - PEG, álcool polivinílico - PVA, albumina, líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos. Como agentes bifuncionais tem-se a epicloridrina, o glutaraldeído, formaldeído, dentre outros (CARVALHO *et al*., 2014).

Souza *et al*. (2014) utilizaram o polietileno glicol (PEG) como aditivo em diferentes concentrações (0,5 a 3,0 % m/v), na formação da sílica pela técnica sol-gel para encapsulamento da lipase de *Burkholderia cepacia.* Após o método de imobilização foi analisada a enzima imobilizada na presença e ausência do PEG. O estudo mostrou que o uso do PEG, com concentração igual a 1%, proporcionou uma

menor área superficial, sendo assim, ocorreu o aumento do volume e diâmetro dos poros da sílica. Com o PEG o rendimento de imobilização aumentou de 43 para 91,4%. Segundo estes autores o uso de macromoléculas, tais como o PEG no processo de imobilização tem sido relatado para induzir uma melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, o que permite um melhor contato entre a interface água/óleo, e favorecendo as condições necessárias para a atividade hidrolítica da lipase imobilizada.

No estudo realizado por Hu *et al*. (2012), a lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada em suporte de sílica comercial (SBA-15) e foi utilizado líquido iônico para melhorar a estrutura dos poros e das propriedades do sistema imobilizado. Os resultados foram comparados ao biocatalisador imobilizado na ausência do líquido iônico e, quando na presença deste aditivo, houve maior atividade específica, melhoramento da estabilidade térmica, estabilidade em solvente orgânico e da capacidade de reutilização, Estas melhorias foram associadas com as mudanças na estrutura de poros e interações mais fortes na superfície da enzima.

Gustafsson *et al*. (2012) utilizaram sílica mesoporosa como suporte para imobilização das lipases de *Mucor miehei* e *Rhizopus oryzae.* Foram utilizadas três tipos de tamanho de partículas de sílica. Os autores verificaram que a atividade específica foi claramente afetada pelo tamanho das partículas e sua morfologia. Ambas as lipases eram mais ativas quando imobilizados nas partículas de 300 nm, pois possuíam maior área superficial.

Em outro estudo, Simões *et al*. (2011) imobilizaram a lipase microbiana de *Candida rugosa* em partículas de SiO_2-quitosana através do método de ligação covalente ativada por epicloridrina e obtiveram 40,7% de rendimento de imobilização, apresentando bom desempenho desse suporte, fornecendo derivado imobilizado com características bioquímicas e cinéticas adequadas para emprego na hidrólise de óleos vegetais.

Embora haja uma variedade de suportes relatados na literatura, a obtenção de novos suportes, principalmente de baixo custo vem sendo estudado nos últimos anos, devido ao custo elevado de alguns suportes disponíveis comercialmente.

Diante deste contexto, a inovação deste trabalho é o uso do tecido de sílica como uma nova matriz para imobilização de lipase, que apresenta em sua composição 96 % de sílica (SiO_2), destacando-se como uma promissora alternativa de suporte inorgânico. Até o presente momento, não há nenhum estudo realizado sobre a imobilização de enzimas em tecido de sílica, somente em outros tipos de tecido (algodão, seda e lã).

2.2.3. Métodos de Imobilização em Suportes de Tecidos

A aplicação de alguns tecidos como suporte para imobilização de enzimas tem atraído muita atenção devido às suas excelentes propriedades, tais como: elevada área superficial específica, o que favorece a eficiência de ligação, boa resistência mecânica e microbiana, estabilidade química, além de apresentarem baixo custo e grande disponibilidade (LI *et al*., 2014; FENG *et al*., 2013).

Li *et al*. (2014) utilizaram tecido de seda como suporte para imobilização da lipase *Candida sp 99-125*, e usou como método de imobilização a adsorção física e ligação covalente. O tecido foi tratado com agente de acabamento hidrofóbico, o polidimetilsiloxano (PDMS). Na ligação covalente foi utilizado o glutaraldeído como agente bifuncional. Os autores verificaram que a imobilização da lipase em tecido de seda tratado com PDMS aumentou a recuperação de atividade de imobilização de 65,7 para 85,9%, comparado com a lipase livre e com o tecido não tratado, além de uma melhoria significativa na estabilidade operacional. Conforme a Figura 8, que ilustra o procedimento para imobilização da lipase em fibras de tecido de algodão, o PDMS resultou em uma forte adsorção na superfície das fibras, na qual as lipases foram fortemente adsorvidas em interfaces hidrofóbicas através de uma grande superfície hidrofóbica que rodeia o sítio catalítico (LI *et al*., 2014).

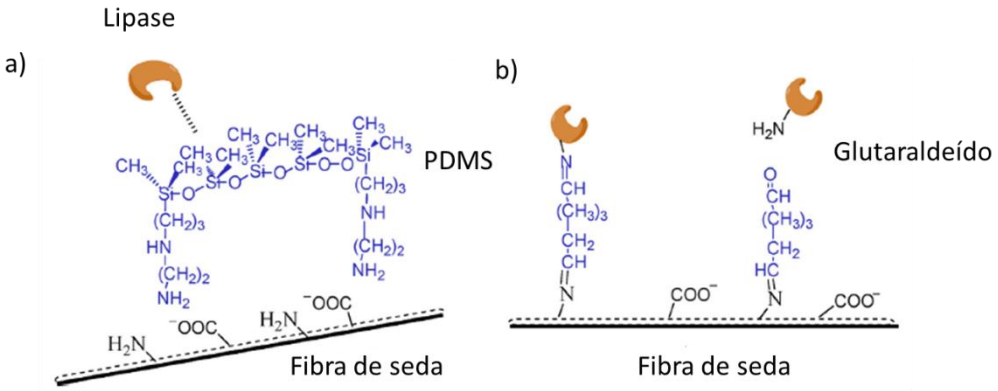

Figura 8. As duas estratégias de tratamento: representação esquemática do tecido de seda exibindo o envolvimento de grupos funcionais NH_2 e COOH: (a) adsorção física e (b) ligação covalente com glutaraldeído (Adaptado de LI *et al*., 2014).

Chen *et al*. (2012) também empregaram tecido de seda para imobilização da lipase de *Cândida sp.* 99e125 através da adsorção. Os autores verificaram que a imobilização da lipase em tecido de seda tratado com PDMS aumentou a atividade

recuperada de imobilização de 65,7 para 85,9%, obtendo uma estabilidade ao longo de um intervalo de pH mais amplo e uma melhor estabilidade térmica comparado com a lipase livre e com o tecido não tratado, além de uma melhoria significativa na estabilidade operacional.

Segundo Ondul *et al*. (2012) fibras de tecido de algodão foram utilizadas com sucesso em estudos de fermentação e de imobilização das células, devido ao custo baixo deste suporte e outras características, tais como: material fibroso amplamente disponível, alta porosidade, grande área superficial específica, e uma excelente resistência mecânica. Além disso, fibras de tecido de algodão podem ser facilmente tratadas com polímeros iônicos como polietilenoimina. De acordo com os autores, o tecido de algodão foi revestido com polietilenoimina (PEI) e utilizado como suporte para a imobilização das lipases *Termomyces lanuginosus* e *Candida antarctica A.* A imobilização da lipase em fibras de tecido de algodão envolveu três etapas: a solução de adsorção do PEI para fibras de tecido de algodão, introdução da enzima na fibra de tecido de algodão contendo PEI, e reticulação do glutaraldeído em agregados PEI-enzima revestidas nas fibras de tecido de algodão. O procedimento para imobilização da lipase em fibras de tecido de algodão é ilustrado na Figura 9. As lipases *T. lanuginosus* e *C. antarctica* foram imobilizadas com sucesso com 180 mg/$g_{suporte}$ e 200 mg/$g_{suporte}$, respectivamente (ONDUL *et al.*, 2012).

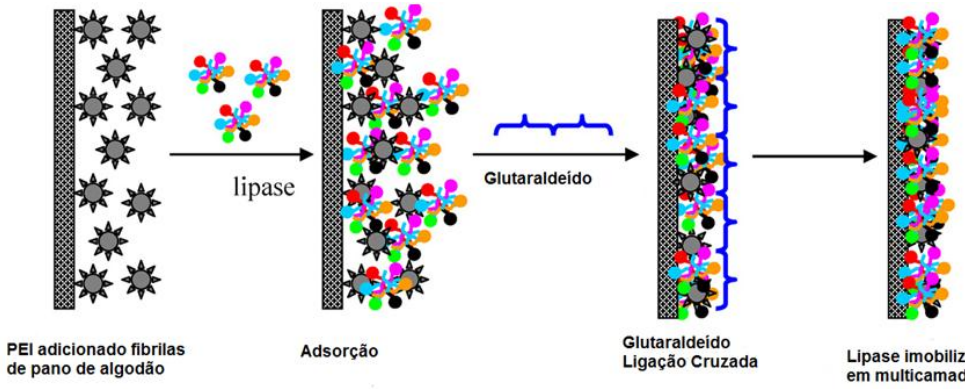

Figura 9. O procedimento e os mecanismos propostos para a imobilização da lipase PEI multicamadas em fibrilas de tecido de algodão (Adaptado ONDUL *et al*., 2012).

No estudo de Feng *et al*. (2013), a lipase Amano de *Pseudomonas fluorescens* foi imobilizada em tecido de lã através da adsorção no tecido tratado com polietilenoimina (PEI) seguido de ligação cruzada com glutaraldeído (GA). Neste

estudo foi obtido um rendimento de imobilização de 46,8% e atividade hidrolítica de 178,3 U. A lipase imobilizada no tecido de lã manteve 81% de sua atividade original após 10 ciclos.

2.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL

As enzimas imobilizadas apresentam características específicas que tornam suas aplicações mais promissoras em relação às enzimas solúveis. O uso deste biocatalisador traz vários benefícios como: reutilização do biocatalisador e melhor controle e qualidade do processo diante de biocatalisadores mais estáveis e resistentes (BON *et al*., 2008).

As lipases possuem grande potencial biotecnológico, devido à sua alta versatilidade, o que permite sua aplicação como biocatalisadores em diferentes indústrias, como por exemplo, na indústria de alimentos, bebidas, têxtil, detergente, bioinseticidas, oleoquímica, farmacêutica, cosméticos, tratamento de efluentes e produção de biodiesel.

2.3.1. Biodiesel

As poucas reservas de combustíveis fósseis, o aumento dos preços de óleos brutos de petróleo, e as preocupações ambientais têm estimulado o desenvolvimento de fontes alternativas de energia renovável. Neste contexto o biodiesel, tem atraído interesse considerável nos últimos anos como combustível renovável, biodegradável e não poluente (NARANJO *et al*., 2010; GOG *et al*., 2012).

Por ser uma fonte de energia alternativa ao combustível convencional, o Biodiesel combina a proteção do ambiente com biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de renovação (NARWAL E GUPTA, 2013). A indústria global de biodiesel cresceu significativamente na última década. Alguns dos principais fatores por trás dessa enorme crescimento são: reduzir a dependência do petróleo importado, alternativa ecológica ao diesel, a redução de emissões de gases de efeito estufa, capaz de ser usado nos motores diesel existentes, sem ou com poucas modificações (DU, 2008).

Devido às suas vantagens ambientais e um aumento do preço do petróleo, é observado um aumento rápido na produção de biodiesel. Até 2010, a oferta de biodiesel foi equivalente à sua demanda e estima-se que, no futuro, a demanda seja superior a sua

produção e ocorrerá aumento em todas as regiões do mundo, de 40,5 bilhões de litros (2015) para 58,5 bilhões de litros em 2020 (AARTHY *et al*., 2014).

Quimicamente o biodiesel consiste de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, derivados a partir de fontes naturais e renováveis tais como óleos vegetais (comestíveis e não comestíveis) e gorduras animais. Óleos e gorduras são constituídos de moléculas de triglicerídeos, os quais são formados por longas cadeias de ácidos graxos ligados a uma única molécula de glicerol. Sendo assim, os métodos mais utilizados para a produção de biodiesel são transesterificação e esterificação destes óleos e gorduras (GULDHE *et al*., 2015).

Entretanto, os óleos e gorduras vegetais usados diretamente como combustíveis em motores possuem alta viscosidade, o que pode levar a deposição de carbono e a fraca atomização do combustível no motor. Com a finalidade de converter estes óleos vegetais adequados para combustíveis o biodiesel é produzido por transesterificação, para diminuir a viscosidade do óleo (ARANSIOLA *et al*., 2014).

Desta forma, o biodiesel tornou-se mais atraente por causa de seus benefícios ambientais. Porém, o custo de produção tem sido a principal barreira na sua comercialização. O principal contribuinte é o custo da matéria-prima. Os produtores de biodiesel são forçados a escolher entre matéria-prima comestível e não comestível. A utilização de matéria-prima comestível suscita preocupação em termos de segurança alimentar, enquanto a matéria-prima não comestível precisa de etapas de pré-tratamento adicionais (NURFITRI *et al*., 2013). Portanto, para aumentar a produção de biodiesel de modo a torná-la economicamente viável e superar esses inconvenientes, os pesquisadores se concentraram na produção a partir de matéria-prima alternativa tais como gorduras não comestíveis ou residuais (AARTHY *et al*., 2014).

2.3.2. Matérias-primas para a produção de biodiesel

Vários fatores, como a disponibilidade, o custo, as propriedades de armazenamento e o desempenho como combustível irão determinar qual o potencial de uma determinada matéria-prima em particular para ser adotada na produção comercial de biodiesel. O custo da matéria-prima representa 70-80% do custo de produção total de biodiesel, o que indica que a seleção da matéria-prima adequada é de considerável importância para assegurar a viabilidade econômica do processo (HASS; FOGLIA, 2006; YUSUF *et al*., 2011; AARTHY *et al*., 2014).

O Brasil possui uma grande extensão territorial destinada para fins agrícolas, portanto apresenta um enorme potencial para a exploração de plantas oleaginosas com o objetivo de produzir combustíveis (VENTURA *et al*., 2010). Devido ao potencial de disponibilidade em diversas plantas oleaginosas tais como pinhão manso, girassol, soja, mamona, palma, babaçu, amendoim, macaúba, buriti, gergelim, canola e outras, o Brasil surge como promissor na produção do biodiesel. A comercialização da produção de biodiesel no Brasil pode fornecer uma oportunidade de diversificação de energia e atividade agrícola, reduzindo a dependência de combustíveis fósseis e contribuindo para o crescimento econômico de forma sustentável (LOPES E NETO, 2011).

O metanol é o álcool mais utilizado atualmente no processo de produção de biodiesel, porém outros álcoois também podem ser usados como o etanol, propanol, iso-propanol e butanol (MOUNGUENGUI *et al*., 2013; ZHAO *et al*., 2015). Em relação à escolha entre metanol e etanol, o etanol é menos tóxico, pois leva a uma menor perda da atividade da lipase e um maior rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos (ZHANG *et al*., 2012).

Na literatura há vários trabalhos utilizando diferentes matérias-primas para a produção enzimática de biodiesel (OLIVEIRA *et al*., 2014; RIBEIRO *et al*., 2014; MICHELIN *et al*., 2015).

Com base neste contexto, a matéria-prima selecionada para este trabalho foi o óleo de coco bruto e o etanol.

2.3.2.1. Óleo de coco

O óleo de coco contém cerca de 60-65% de óleo e é produzido pelo esmagamento da copra, o núcleo seco. No Brasil, ele é amplamente produzido, principalmente na região Nordeste (KRISHNA *et al*., 2010; RIBEIRO *et al*., 2014).

O óleo de coco pertence ao grupo de ácido láurico dos óleos vegetais, contendo geralmente de 46% a 49%. Óleo de coco (*Cocos nucífera* L.) é típico de regiões de clima tropical e é cultivado em aproximadamente 93 países. Tem origem no Sudeste Asiático e os maiores produtores mundiais são: Filipinas, Indonésia e Índia. No Brasil a cultura do coqueiro, ampla variedade, chegou possivelmente, na colonização portuguesa em 1553, oriunda da ilha de Cabo Verde, que por sua vez, foram originadas de plantações Indianas, introduzidas na África (BOUAID *et al*., 2010; JERONIMO, 2012).

2.3.3. Reação de transesterificação

O método mais utilizado para a obtenção do biodiesel é transesterificação, o qual possui muitas vantagens em relação a outros processos, como por exemplo, é realizada sob condições normais e que gera um bom rendimento de melhor qualidade do biodiesel (SHAHID; JAMAL, 2011).

A transesterificação é uma reação química que consiste em processos reversíveis consecutivos dos triglicerídeos com álcoois de cadeia curta como metanol ou etanol (Figura 10). O primeiro estágio é a conversão dos triglicerídeos em diglicerídeos, seguido da conversão dos diglicerídeos em monoglicerídeos, e os monoglicerídeos em glicerol, gerando uma molécula de metil ou etil éster a partir de cada glicerídeo em cada etapa (ABBASZAADEH *et al*., 2012).

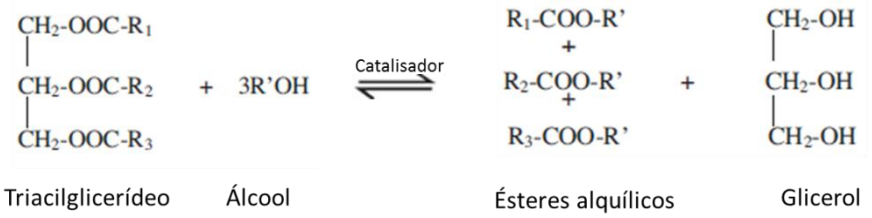

Figura 10. Transesterificação de triglicerídeos com álcool (ABBASZAADEH *et al*., 2012).

As variáveis operacionais mais importantes que influenciam o processo de transesterificação são condições de reação, a relação molar de álcool para óleo, o tipo de álcool, tipo e quantidade de catalisador, temperatura de reação e da pressão, tempo de reação e o conteúdo de ácidos graxos livres (FFAs) (BALAT, 2011).

A reação de transesterificação é realizada na presença de um catalisador, o qual tem a finalidade de acelerar a velocidade reacional. Os catalisadores utilizados para a produção de ésteres alquílicos podem ser agrupados em quatro categorias: alcalinos, ácidos, enzimáticos e catalisadores heterogêneos inorgânicos (GOG *et al*., 2012).

A transesterificação química de óleos vegetais para biodiesel foi industrialmente adotado devido às altas taxas de conversão e baixo tempo de produção. No entanto, este processo apresenta diversas desvantagens como alto consumo de energia, difícil separação dos produtos, substratos e dos catalisadores envolvidos no processo, além da formação de sabão na presença de água. Isto levou ao desenvolvimento do processo de reações de transesterificação catalisadas por enzimas imobilizadas para a produção de

biodiesel, que é caracterizada por certas vantagens ambientais e econômicas sobre o método químico convencional (FUKUDA *et al.*, 2001; DU, 2008; GUPTA E NAWAL, 2013; CHRISTOPHER *et al*., 2014).

Diante deste contexto, as enzimas têm se tornado uma das alternativas para superar os inconvenientes da catálise química na produção de biodiesel. A transesterificação catalisada por enzimas incluem: condições mais suaves, que implica menor consumo de energia, maior diversidade na seleção das matérias-primas, incluindo óleos usados com elevada acidez, não formam sabões, facilmente separado do meio reacional, se a enzima é imobilizada, as enzimas podem ser reutilizadas, a capacidade de converter ambos os ácidos graxos livres e triglicerídeos em biodiesel em uma única etapa, álcool inferior à proporção de óleo, menor geração de efluentes, menor emissão de poluentes, mais fácil separação e recuperação do produto, biodegradabilidade e aceitação ambiental (ZHANG *et al*., 2012; GOG *et al*., 2012; GUPTA E NAWAL, 2013; CHRISTOPHER *et al*., 2014).

No entanto, a enzima livre como biocatalisador tem algumas desvantagens tais como alto custo, baixa estabilidade e não pode ser reutilizada. Um importante avanço é a tecnologia de imobilização de enzimas, que foi desenvolvida para melhorar a estabilidade da enzima e sua reutilização para a produção de biodiesel (ZHANG *et al*., 2012).

Portanto, a transesterificação enzimática está se tornando cada vez mais atrativa na produção de biodiesel, uma vez que o glicerol produzido como um subproduto pode ser facilmente recuperado e a purificação de ésteres etílicos de ácidos graxos é simples de realizar, proporcionando o produto de alta pureza (BAI *et al*., 2014).

CAPÍTULO III

Este capítulo está representado na forma de artigo científico e está organizado de acordo com as normas propostas pelo periódico de publicação.

ARTIGO — "Tecido de sílica como uma nova matriz para imobilização de lipases e seu emprego em reações de transesterificação". A versão em inglês deste artigo será submetida ao periódico *Bioresource Technology*.

ARTIGO

Tecido de sílica como uma nova matriz para imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* e seu emprego em reações de transesterificação

Islânia S. Lima[a], Matheus B. Costa[a], Márcia C. Neves[b], Cleide M. F. Soares [a,c], Eliane B. Cavalcanti[a,c], Mara G. Freire[b], Luiz F. F. Romanholo[a,c], Álvaro S. Lima [a,c,*]

[a] Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.
[b] Departamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.
[c] ITP, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300-Prédio do ITP, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

* Para quem a correspondência deve ser endereçada:

Tel: +55 7932182115; Fax: +55 7932182190; E-mail: alvaro_lima@unit.br

RESUMO

Este trabalho analisou a utilização de tecido de sílica como suporte na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) por meio dos métodos de imobilização por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC). Posteriormente, o biocatalisador imobilizado foi aplicado na reação de transesterificação. A partir do estudo das propriedades bioquímicas para o biocatalisador imobilizado por LC, foram obtidos os seguintes resultados: pH ótimo de 7,0 e temperatura de 60 °C, no estudo de cinética o K_m e o $V_{máx}$ foram de 176,72 mM e 79,37 μmol/min, respectivamente, o tempo de meia-vida foi de 33 h. A lipase imobilizada manteve 60 % de sua atividade relativa após 3 reusos. Na reação de transesterificação utilizando óleo de coco e etanol, foi obtida uma conversão máxima de 47,31 % com o tempo de reação de 96 h a 40 °C. Através da caracterização físico-química e morfológica do biocatalisador imobilizado, foi possível comprovar a presença da lipase no tecido, confirmando a imobilização.

Palavras-chave: tecido de sílica, lipase, imobilização.

1. INTRODUÇÃO

A catálise enzimática é considerada uma tecnologia mais verde, pois apresenta várias vantagens em comparação aos catalisadores químicos convencionais, como condições de reações mais suaves (pH, temperatura e pressão), menor geração de efluentes, baixo consumo de energia e produtos com elevado grau de pureza (Guldhe et al., 2015). Entretanto, há algumas limitações quanto à aplicação em escala industrial das lipases, pois apresentam custo elevado, baixa estabilidade e não podem ser reutilizadas. Portanto, para superar essas barreiras, as enzimas estão sendo utilizadas em técnicas de imobilização, que permitem a reutilização do biocatalisador, maior facilidade de separação dos produtos do meio reacional, além de aumentar a sua estabilidade operacional (You et al., 2013; Zhang et al., 2012).

A imobilização de enzimas pode ser realizada por vários métodos, sendo os mais comuns: a adsorção física e ligação covalente. A técnica de adsorção física é um método barato e simples de executar, porém as interações formadas entre a enzima e o suporte são muitas vezes instáveis, podendo resultar na lixiviação da enzima. Na ligação covalente, a ligação entre a enzima e o suporte é mais forte, tornando o biocatalisador mais estável, porém pode levar a uma perda da atividade e estabilidade (Zubiolo et al., 2014; Ivetić et al., 2014).

As características do suporte têm uma importância fundamental na determinação do desempenho da enzima imobilizada e sua escolha depende de várias propriedades como resistência mecânica e microbiana, estabilidade térmica e química, funcionalidade química, carácter hidrófobo/hidrófilo, custo e reutilização (Ondul et al., 2012). Diversos suportes já foram propostos na literatura para a imobilização de lipases, tais como alginato (Abdulla et al., 2013), quitosana (Silva et al., 2012), PHBV (Cabrera-Padilla et al., 2011), sílica (Barbosa et al., 2014). Contudo, na busca da eficiência do método de imobilização de enzimas ainda tem-se a necessidade do desenvolvimento de novos suportes, principalmente de baixo custo. Deste modo, a aplicação de alguns tecidos como suporte para imobilização de enzimas tem atraído muita atenção devido às suas excelentes propriedades, tais como: elevada área superficial específica, o que favorece a eficiência de ligação, boa resistência mecânica e microbiana, estabilidade química, além de apresentarem baixo custo e grande disponibilidade (Li et al., 2014; Feng et al., 2013). Alguns tecidos como algodão, seda e lã já foram relatados na literatura (Ondul et al., 2012; Li et al., 2014; Feng et al., 2013). Entretanto, até o presente momento, ainda não

foi verificado o uso de tecido de sílica como suporte para a imobilização de enzima, evidenciando a relevância deste estudo para o desenvolvimento de sistemas imobilizados.

Várias enzimas têm sido imobilizadas em vários suportes tais como: *β*-glucosidase em sílica mesoporosa por adsorção física e ligação covalente (Ivetić et al., 2014), *Candida antarctica* em quitosana por ligação covalente (Silva et al., 2012), *Burkholderia cepacia* em sílica aerogel por encapsulação (Barbosa et al., 2014).

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a quebra de óleos e gorduras, com posterior liberação de ácidos graxos livres, acilgliceróis e glicerol. Adicionalmente, estas enzimas também podem catalisar reações de transesterificação, esterificação e aminólise. Esta capacidade de atuar em diferentes tipos de reações caracteriza a lipase como um grupo promissor de biocatalisador (Hasan et al., 2009; Mendes et al., 2011; Sugahara e Varéa, 2014). As lipases podem ser produzidas a partir de fontes animal, vegetal ou microbiana, sendo esta última a que possui maior potencial biotecnológico devido a alguns fatores como baixo custo de produção, fácil modificação de suas propriedades, elevado rendimento do produto, estabilidade em solventes orgânicos, possuem ampla especificidade de substrato, apresentam maior estabilidade térmica, além do potencial aplicação em diversas indústrias como alimentos, farmacêutica, detergentes, têxtil, cosméticos e biodiesel (Antczak et al., 2009; Narwal e Gupta, 2013).

Diante deste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o uso de tecido de sílica como uma nova matriz para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) pela técnica de adsorção física e ligação covalente e aplicação na reação de transesterificação. Inicialmente estudou-se a influência da metodologia de imobilização na obtenção do biocatalisador. Também foi estudado o efeito do carregamento enzimático, a caracterização bioquímica, físico-química e morfológica do biocatalisador imobilizado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais e reagentes

A lipase utilizada na imobilização é de origem microbiana de *Burkholderia cepacia* (BC) adquirida comercialmente da Sigma Aldrich (≥ 30,000 U/g, pH 7,0, 50 °C). Os reagentes utilizados foram: Hexano p.a. 99 % (Synth, Brasil); óleo de coco

adquirido do mercado local; Etanol (> 99 % puro), polietilenoglicol (PEG 1500, Synth); epicloridrina (EPI) da Sigma Aldrich, água mili-Q e Solução de Karl Fisher isenta de Piridina (Merck, Alemanha). Nas reações de hidrólise foram utilizados o azeite de oliva comercial extra virgem com baixa acidez (Carbonell), goma arábica em pó pura (Synth, Brasil).

O tecido de sílica foi obtido pela empresa Seecil Carbon Technologies (Brasil), e apresenta as seguintes características: teor de sílica de 96 %; largura e espessura nominal de 86,4 cm e 0,0762 cm, respectivamente; ponto de fusão de 1722,22 °C; temperatura de uso contínuo a 982,22 °C. O tecido de sílica foi utilizado como suporte sem nenhum pré-tratamento neste estudo.

2.2. Imobilização da lipase em tecido de sílica

Inicialmente foi estudado o efeito da razão enzima/suporte (0,10, 0,15, 0,20, 0,25 e 0,30 $g/g_{suporte}$) no processo de imobilização da lipase por adsorção física e ligação covalente em tecido de sílica com dimensões 3x3 cm (9 cm^2), com aproximadamente 0,6 g.

Na técnica de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* por adsorção física (ADS) foi realizada conforme descrito por Soares et al. (2004a), com algumas modificações. Tecido de sílica de 9 cm^2 foi deixado em contato com 6 mL de hexano por 15 min sob agitação constante de 100 rpm a 25 °C com o intuito de remover a umidade do tecido. Em seguida, o tecido de sílica tratado com hexano foi posto em contato com 6 mL de solução enzimática (massa de enzima solubilizada em 6 mL de água ultra-pura) por 3 h sob agitação constante de 100 rpm. Após esse período, a solução foi mantida à 4 ºC por 24 h. Em seguida, o biocatalisador imobilizado foi lavado com hexano e seco em dessecador a temperatura ambiente por 48 h.

A imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* pelo método de ligação covalente (LC) foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por Simões et al. (2011), com algumas modificações. Inicialmente, o suporte foi ativado com solução de epicloridrina 2,5 % (v/v) em tampão fosfato de potássio (0,1M e pH 7), na proporção massa:volume de 1:10. Após a homogeneização, a mistura foi mantida sob agitação por 2 h à temperatura ambiente e em seguida submetida à filtração a vácuo, sendo lavado com água destilada e solução tampão de fosfato, e posteriormente levado à estufa (60 ºC) por 18 a 20 h. O suporte ativado foi deixado em contato com hexano numa

proporção de 1:10 (solido:líquido) e mantido sob agitação por 2 h. Em seguida, adicionou-se a lipase nas diferentes razões descritas acima, diluída em 1 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7). Solução contendo 5 mg/mL de polietilenoglicol (PEG-1500) foi adicionado como estabilizante da enzima, na proporção de 100 μL/g de suporte. Depois, o sistema foi deixado em agitação por 2 h, seguida de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 ºC. A recuperação do biocatalisador imobilizado foi realizada por filtração a vácuo, seguida de lavagens com hexano e seco em dessecador à temperatura ambiente durante 48 h.

2.3. Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade hidrolítica das lipases na sua forma livre e imobilizada foi determinada por meio do método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com a metodologia descrito por Soares et al. (1999). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio (37 °C, pH 7.0). A atividade hidrolítica foi utilizada para determinar o rendimento de imobilização (RI %), que foi calculada através da Eq. (1):

$$\mathrm{RI}\,(\%) = \frac{Us}{Uo} \times 100 \qquad (1)$$

onde: U_0 é a unidade de atividade oferecida para a imobilização; U_s é a unidade de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa de biocatalisador imobilizado – base seca).

2.4. Caracterização bioquímica da lipase livre e imobilizada

2.4.1. Efeito do pH e da Temperatura na Atividade Hidrolítica

O efeito do pH sobre a atividade relativa da lipase BC livre e imobilizada foi testada utilizando tampões ácido cítrico-citrato de sódio 0,1 M (pH 2,0-5,0), fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,0-8,0) e bicarbonato-carbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0). O efeito da temperatura foi determinada a pH 7,0 com intervalo de temperatura de 25 ºC à 80 ºC.

2.4.2. Estabilidade térmica e operacional

A termoestabilidade da lipase livre e imobilizada foi determinada por meio da incubação de diversas amostras da LBC livre e imobilizada a 60 °C em meio-aquoso (0,1 M tampão fosfato, pH 7,0) até 240 min. Em seguida, a atividade residual foi determinada a 50 e 60 °C, para a lipase livre e imobilizada, respectivamente. A constante de inativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), foram calculadas pelas Eq. (2) e (3), respectivamente (ZANIN, 1998).

$$A = A_{in} \exp\left(-k_d \cdot t\right) \tag{2}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0{,}5}{-k_d} \tag{3}$$

onde: A = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação (U); A_{in}= atividade enzimática inicial (U); k_d = constante de desativação (h^{-1}); $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida (h).

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi determinada em reações de hidrólise em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado, tendo como parâmetro a redução de 50% de atividade inicial. A reação de hidrólise consistiu de 10 minutos a uma temperatura de 60 °C e pH 7.

2.4.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando de 37 a 2604 mM, obtidos através de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva (1 a 70 %) e solução aquosa de goma arábica (7% p/v) para o cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m). Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados de acordo com a linearização de Lineaweaver-Burk.

2.5. Reação de transesterificação enzimática

As reações ocorreram utilizando 6 g de substrato que consistiu em óleo de coco bruto e etanol, sem a adição de solventes e uma proporção fixa de 10 % de biocatalisador em relação ao peso total dos reagentes que participam da reação (FREITAS et al., 2009). As reações foram conduzidas em frascos fechados imersos em

banho termostatizado com agitação a 150 rpm. As condições reacionais para a transesterificação foram: razão molar óleo:etanol (1:7) e temperatura de 40 °C em diferentes tempos de reação (24 , 48, 72, 96 e 120 h). As amostras foram lavadas com solução saturada de NaCl para a separação das fases (orgânica e não orgânica). A fase orgânica foi retirada e posteriormente adicionou-se sulfato de sódio anidro para extração de água remanescente e obtenção dos ésteres etílicos puro. As amostras foram quantificadas por cromatografia gasosa em cromatógrafo da marca Agilent Technologies (7820-A GC) acoplado ao detector de massas (MSD 5975), contendo coluna Supelcowax10 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25μm de espessura). A temperatura do forno foi mantida a 130 ºC durante 2 minutos, posteriormente aumentada para 220 ºC a uma taxa de 20 ºC/min, em seguida a temperatura foi elevada até 222 ºC com uma taxa de 0,5 ºC/min e por último para 250 ºC a uma taxa de 20 ºC/min, permanecendo nesta temperatura por 3 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio no fluxo de 1 mL/min. O injetor foi mantido em 250 ºC no modo split (30:1), com volume de injeção de 1 μL. A temperatura da fonte de íons foi mantida a 250 °C. O tempo total de corrida foi de 14,9 min com corte do solvente de 2 minutos.

2.6. Propriedades morfológicas e físico-químicas

2.6.1. Brunauer–Emmett–Teller (BET)

As áreas de superfície do tecido de sílica e do biocatalisador imobilizado foram calculadas usando o método de Brunauer-Emmett-Teller (Brunauer et al., 1938). Os volumes dos poros e seus diâmetros foram calculados com base no modelo desenvolvido por Barret, Joyner e Halenda (BJH). As áreas superficiais do tecido de sílica e do biocatalisador imobilizado foram avaliadas de acordo com a adsorção de nitrogênio usando o equipamento Gemini V (Micromerities).

2.6.2. Medida do ânuglo de contato

A hidrofobicidade da superfície do tecido de sílica foi medida pelos ângulos de contato medidos nas superfícies empregando os líquidos água e formaldeído utilizando o equipamento OCA20 (Dataphysics).

2.6.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens das amostras do tecido de sílica e do biocatalisador imobilizado foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (modelo Hitachi SU-70) acoplado a espectroscopia de dispersão de energia (EDS) utilizando o equipamento Bruker QUANTAX 400.

2.6.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 600 a 4000 $cm^{-1,}$ para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado utilizando o equipamento Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) Cary 630 (Agilent Techologies).

2.6.5. Difratometria de raio-X (DRX)

A análise da cristalinidade das amostras foi obtida por meio de um difratômetro de raio-X da marca Panalytical Empyrean equipado com um detector de Pixcel 1 D, utilizando fonte de radiação Cu-K$\alpha_{1,2}$ (λ_1 = 1,540598 Å; λ_2 = 1,544426 Å), submetida a uma tensão de 45 KV e uma corrente de 40 mA. Foi calculado o índice de cristalinidade de acordo com o método empírico de Segal et al. (1959):

$$I_c\,(\%) = \frac{I_{(002)} - I_{am}}{I_{(002)}} \times 100$$

onde: I_c (%) = índice de cristalinidade; $I_{(002)}$ = pico de intensidade da difração que representa o material cristalino perto de $2\theta = 22°$; I_{am} = pico de intensidade da difração que representa o material amorfo perto de $2\theta = 18°$.

2.6.6. Análise Termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas pelo equipamento Shimadzu DTG-60 H Simultaneous DTA-TG apparatus e analisados no software Thermogravimetric

Analyser, sob as condições operacionais: razão de aquecimento de 10 °C/min^{-1}, na faixa de temperatura de 25 a 800 °C, com massa de 6 mg e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Imobilização da lipase

O rendimento de imobilização através das técnicas de adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC) com epicloridrina foram avaliados e os resultados são apresentads na Figura 11. O biocatalisador imobilizado por ligação covalente obteve melhor carregamento de imobilização da lipase sobre o tecido de 0,1 $g_{enzima}/g_{suporte}$ com 80% de rendimento de imobilização. Acima desta concentração, o rendimento de imobilização teve uma tendência a diminuir. Segundo Cabrera-Padilla et al. (2011) isto pode ser devido à saturação do suporte pela lipase.

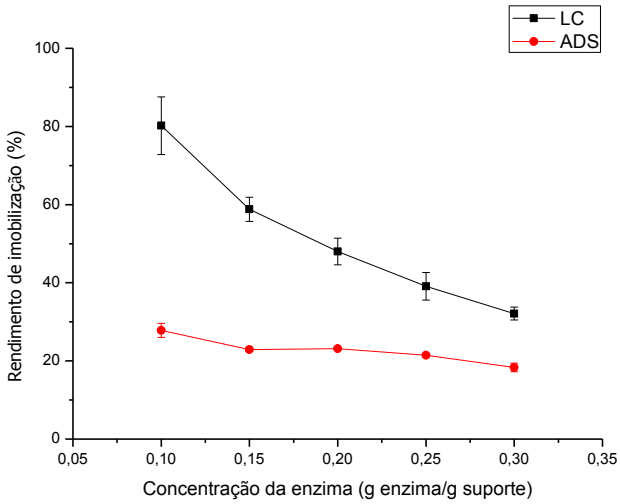

Figura 11. Rendimento de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) em função das diferentes razões enzima/suporte à temperatura de 37 °C.

O sistema imobilizado por ligação covalente apresentou maior rendimento de imobilização em comparação ao sistema imobilizado por adsorção física, que obteve rendimento máximo de 27 %, somente. Portanto, o método de imobilização por ligação covalente resultou em um método mais eficaz de imobilização no tecido de sílica. De acordo com a literatura, o processo de imobilização por adsorção física ocorre por interações fracas, já a ligação formada entre a enzima e o suporte pela técnica de ligação covalente é mais forte, podendo conferir maior estabilidade ao biocatalisador

comparado à técnica de adsorção física, além da influência do aditivo polietilenoglicol (PEG-1500) que proporciona um aumento da atividade catalítica (Zubiolo et al., 2014; Souza et al., 2014).

Li et al. (2014) verificaram um rendimento de 75 % na imobilização da lipase de *Candida* sp. em tecido de seda por meio da técnica de ligação covalente utilizando o gluataraldeído como agente bifuncional. Em outro estudo, Carvalho et al. (2013) relataram um rendimento de 50 % para a lipase de *Bacillus sp.* ITP-001 imobilizada em sílica produzida pela técnica sol-gel. Yang et al. (2010) utilizaram sílica gel como suporte para imobilização da lipase de *Arthrobacter sp.* por meio do método de ligação covalente com glutaraldeído. Neste estudo foi obtido um rendimento de imobilização de 72 %.

Comparando o resultado obtido com outras enzimas imobilizadas em outros tipos de suportes, como mencionados antetiormente, o resultado do rendimento de imobilização por ligação covalente no tecido de sílica é considerado satisfatório, portanto o tecido de sílica pode ser um excelente material de suporte para imobilização, onde se obtém um alto rendimento de imobilização.

A partir dos resultados obtidos na imobilização, foi selecionado o método por LC para o estudo das propriedades bioquímicas, estabilidade operacional e caracterização físico-química e morfológica do biocatalisador imobilizado, já que o método por ADS apresentou baixo rendimento de imobilização.

3.2. Efeito do pH e Temperatura

O pH é um dos parâmetros mais importantes que pode alterar a atividade da enzima e o seu efeito depende do método de imobilização e as interações entre a enzima e o suporte (Uyanik et al., 2011). O efeito do pH sobre a atividade da lipase de BC livre e imobilizada foi determinado entre 2 e 9, como mostrado na Figura 12. Como pode ser visto, tanto a lipase de BC livre e imobilizada, apresentaram pH ótimo de 7,0. Com isso, o método de imobilização por ligação covalente não alterou o pH ótimo da enzima.

Alguns resultados similares foram descritos na literatura, como no estudo realizado por Wang et al. (2012) na imobilização da lipase pancreática por ligação covalente em sílica mesoporosa, que resultou em pH ótimo de 7,0 para a lipase livre e

imobilizada. Em outro estudo, Chen et al. (2012) obtiveram pH ótimo de 8,0 para a lipase de *Candida* livre e imobilizada em tecido de seda.

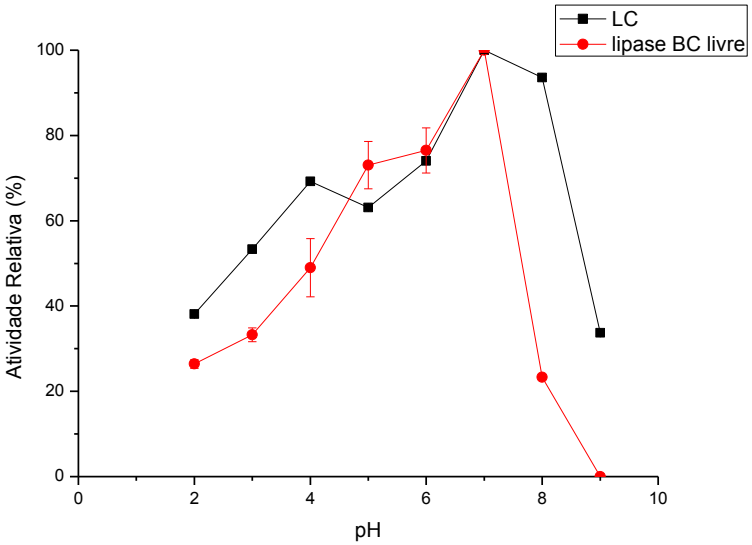

Figura 12. Efeito do pH na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por ligação covalente (LC) à temperatura de 37 °C.

Outro parâmetro importante no procedimento de imobilização e que pode alterar a atividade da enzima é o estudo de temperatura da lipase imobilizada. Geralmente, as enzimas imobilizadas apresentam temperaturas ótimas mais elevadas do que as de enzimas livres (Chen et al., 2012).

Pode-se notar na Figura 13 que a atividade máxima da lipase livre e imobilizada ocorreu a 50 e 60 °C, respectivamente, onde a lipase livre teve uma redução brusca de sua atividade acima da sua temperatura ótima, enquanto a lipase imobilizada manteve mais de 70 % da sua atividade a temperaturas mais elevadas. Estes resultados sugerem que a estabilidade da lipase aumentou após a imobilização, possivelmente devido à conformação mais rígida fornecida pelo suporte, sendo assim capaz de manter a sua atividade catalítica, ao contrário da lipase livre que a temperaturas elevadas pode sofrer desnaturação térmica (Cabrera-Padilla et al., 2011). Do mesmo modo, este comportamento pode ser resultado de criação de limitações conformacionais em movimentos de enzima como efeito das interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte (Zubiolo et al., 2014; Uyanik et al., 2011; Mateo et al., 2007).

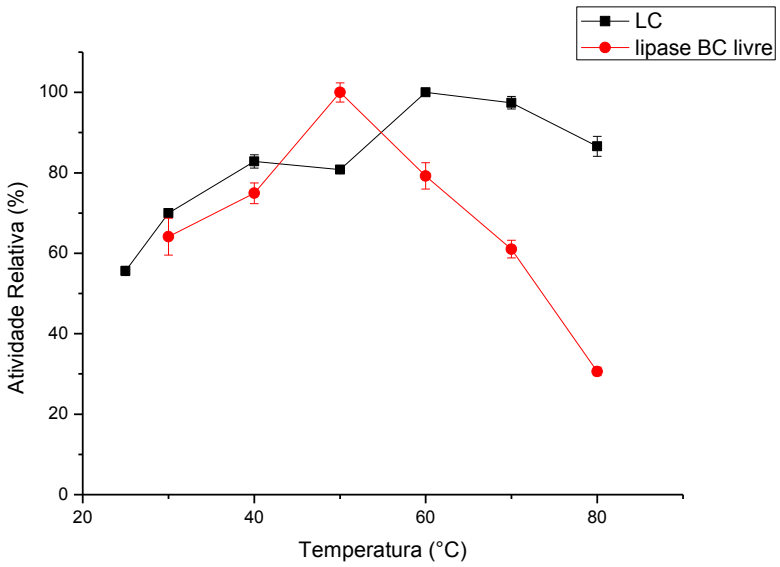

Figura 13. Efeito da temperatura na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por ligação covalente (LC).

Resultados similares foram relatados por Da Rós et al. (2010) e Hu et al. (2012) na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em SiO_2-PVA e sílica mesoporosa, respectivamente, em que ambos apresentaram atividade máxima em 60 °C. Em outro estudo utilizando fibra de tecido de algodão na imobilização da lipase de *Candida antártica A*, os autores obtiveram atividade máxima a 60 °C (Ondul et al., 2012).

3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram estudados utilizando diferentes concentrações de substrato para lipase BC livre e imobilizada. O substrato usado foi a emulsão de azeite e as reações foram realizadas a pH e temperatura ótima para a lipase livre e imobilizada. Os valores de K_m (mM) e $V_{máx}$ (µmol/min) foram calculados pela equação de Michaelis-Menten, e estão apresentados na Tabela 3.

Fazendo a comparação dos resultados obtidos para a lipase de BC livre e imobilizada, pode-se notar que o valor de K_m do biocatalisador imobilizado (176,72 mM) diminuiu em relação ao valor de K_m da lipase de BC livre (505,4 mM). Portanto, estes resultados sugerem uma mudança na afinidade da enzima para o substrato após a imobilização, indicando que esta aumentou significativamente. Este aumento pode ser devido ao microambiente da enzima imobilizada, sendo hidrofóbico, com baixo teor de

água, é atraído pelo substrato que também é hidrofóbico. No caso da enzima livre, essa atração pelo substrato se reduz devido maior grau de hidrofilicidade da lipase (Cabrera-Padilla et al., 2011). No estudo de Da Rós et al. (2010), os autores observaram também que o K_m diminuiu mediante a imobilização da lipase de BC em SiO_2-PVA por ligação covalente com epicloridrina.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da enzima livre e imobilizada.

	K_m (mM)	**V_{max} (µmol/mg.min)**
Lipase livre	505,4	2000
Lipase imobilizada	176,72	79,37

Com relação ao valor de $V_{máx}$ da lipase de BC imobilizada (79,37 µmol/mg.min**)**, esta teve uma diminuição brusca em relação a lipase de BC livre (2000 µmol/mg.min). Isto pode ser devido à fixação inadequada da enzima sobre o suporte, podendo induzir a uma conformação inativa à enzima e/ou a mudança das propriedades dos seus sítios ativos que podem impedir a ligação do substrato ao sítio ativo, uma vez que o processo de imobilização não pode controlar a orientação adequada da enzima sobre o suporte (Bayramoglu e Arica, 2014).

3.4. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da lipase de BC livre e biocatalisador imobilizado foi realizada a 60 °C. A Figura 14 mostra que o biocatalisador imobilizado por ligação covalente exibiu uma estabilidade térmica mais elevada em comparação à enzima livre. Verifica-se pelo perfil das curvas que a atividade relativa da lipase livre diminuiu para cerca de 55 % após o período de incubação, enquanto que a lipase na forma imobilizada manteve a atividade relativa em torno de 90 % durante todo o tempo de incubação. Esses resultados indicam que o método de imobilização atuou no sentido de aumentar a estabilidade térmica da lipase de BC.

A estabilidade térmica também foi avaliada calculando a constante de inativação térmica (K_d) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase livre e do biocatalisador imobilizado. A partir da Tabela 4 pode-se verificar que a imobilização influenciou

positivamente na estabilidade térmica da lipase, proporcionando para o biocatalisador imobilizado um maior tempo de meia vida (33,7 h) quando comparado a lipase de BC livre (4,6 h), correspondente a um aumento na estabilidade térmica de aproximadamente 7 vezes.

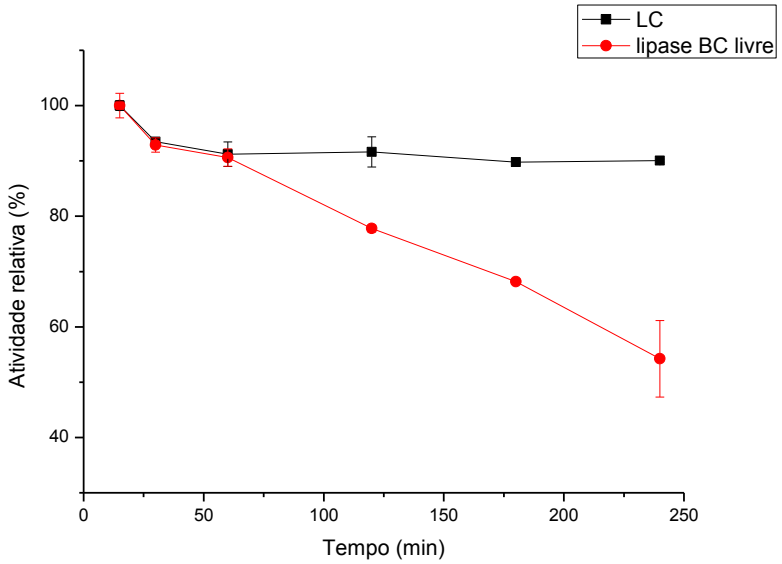

Figura 14. Estabilidade térmica da lipase de BC livre e imobilizada por ligação covalente (LC) incubada a 60 ºC.

Comparando a constante de inativação térmica (K_d) da enzima livre com o valor obtido para o biocatalisador imobilizado na Tabela 4, verifica-se que a imobilização alterou significativamente a inativação térmica da enzima, pois o valor da K_d do biocatalisador imobilizado (0,00034 h^{-1}) foi inferior ao da lipase livre (0,0025 h^{-1}), aumentando assim o tempo de meia vida $t_{(1/2)}$ (h) da lipase, conferindo maior estabilidade térmica para enzima quando imobilizada por ligação covalente em tecido de sílica.

Tabela 4. Valores da constante de inativação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{(1/2)}$) para a lipase de BC livre e imobilizada por LC a 60 °C.

Lipase	**K_d (h^{-1})**	**$t_{(1/2)}$ (h)**
Livre	0,0025	4,6
Imobilizada	0,00034	33,7

Alguns resultados foram relatados na literatura utilizando diferentes tipos de suporte e enzimas. No estudo de Simões et al. (2011) avaliaram a estabilidade térmica da lipase *Candida rugosa* imobilizada em matriz híbrida SiO_2-quitosana e obtiveram

valores de $t_{(1/2)}$ de 1,63 h e valor de K_d de 0,43 h^{-1}. Neste estudo os autores relataram um aumento da estabilidade térmica da lipase em aproximadamente 9 vezes após a imobilização.

Em outro estudo, utilizando suporte de sílica produzida pela técnica sol-gel, realizado por Zubiolo et al. (2014) na imobilização da lipase *Aspergillus niger*, obtiveram valores de K_d de 0,094 h^{-1} e $t_{(1/2)}$ de 7,4 h, que proporcionou um aumento da estabilidade térmica de 1,5 vezes.

3.5. Estabilidade Operacional

A capacidade de reutilização da enzima imobilizada tem uma importância significativa em aplicações industriais, uma vez que o reuso do biocatalisador diminuem os custos do processo. A estabilidade operacional da lipase de BC imobilizada em tecido de sílica foi avaliada por meio da reação de hidrólise em emulsão de azeite de oliva por 10 min a 60 ºC. Conforme a Figura 15 pode-se verificar que a lipase de BC imobilizada em tecido de sílica pode ser reutilizada até 3 vezes, mantendo 60 % da sua atividade inicial.

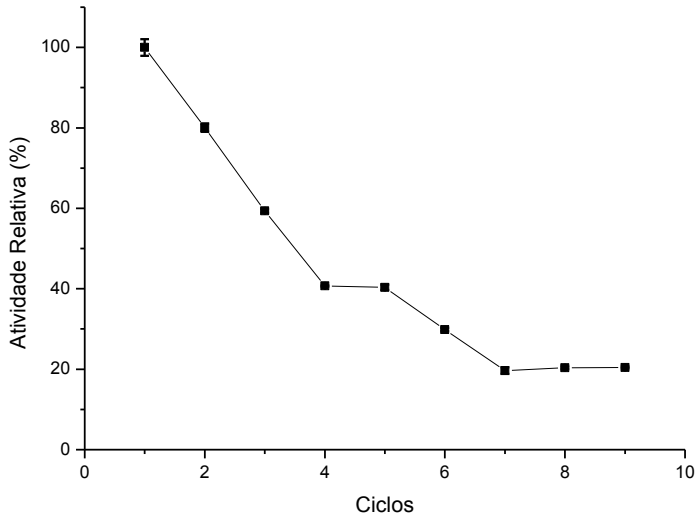

Figura 15. Estabilidade operacional da lipase imobilizada por ligação covalente (LC) em tecido de sílica (T = 60 °C; pH 7,0; tempo de reação: 10 min).

Alguns resultados de estudo sobre estabilidade operacional foram descritos na literatura. A lipase pancreática foi imobilizada em sílica mesoporosa por ligação covalente. Neste trabalho os autores observaram que o biocatalisador imobilizado pode

ser reutilizado até 5 vezes mantendo 50% da sua atividade relativa inicial (Wang et al., 2012). No estudo de Chen et al. (2012), a estabilidade operacional da lipase *Candida* sp. imobilizada em tecido de seda foi avaliada por lotes sucessivos de esterificação de ácido dodecanóico com álcool laurílico, no qual obteve um elevado rendimento de ésteres (>97 %) para 10 ciclos de reutilização. Hu et al. (2012) imobilizaram a lipase de BC em sílica mesoporosa por adsorção física e relataram que após 3 ciclos de reutilização a atividade da lipase imobilizada caiu mais de 40 % de sua atividade inicial.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, a reutilização da lipase imobilizada em tecido de sílica é eficiente, pois apresentou uma boa estabilidade operacional, podendo chegar até 5 ciclos mantendo 40 % de sua atividade inicial (Figura 15).

3.6. Reação de Transesterificação

O biocatalisador imobilizado foi aplicado na reação de transesterificação utilizando óleo de coco e etanol. A reação foi monitorada determinando a conversão de ésteres etílicos e foi analisada a influência do tempo de reação, como mostra a Figura 16. Neste estudo foi obtida uma conversão máxima de 47,31 % de ésteres etílicos com o tempo de reação de 96 h a 40 °C.

Resultado similar foi obtido por Da Rós et al. (2010), utilizando sebo bovino e etanol na reação de transesterificação catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em óxido de nióbio (Nb_2O_5). Os autores obtiveram 40,21 % de conversão de ésteres etílicos, na proporção molar de 1:12 a temperatura de 50 °C.

No estudo realizado por Ribeiro et al. (2014), os autores analisaram as variáveis (temperatura, concentração de enzima, razão molar óleo:álcool e tipo de álcool) para verificar a influência das mesmas na transesterificação de óleo de coco catalisada pela lipase imobilizada comercial Novozym 435. Neste estudo foi obtida uma conversão de 80,5 % utilizando etanol, nas seguintes condições: concentração da enzima a 7%, razão molar de óleo:álcool (1:10) e temperatura a 60 °C. Em outro estudo, Naranjo et al. (2010) estudaram a influência do tipo de álcool na transesterificação de óleo de palma catalisada pela lipase *Candida antarctica B* imobilizada em tecido de carbono, e obtiveram uma conversão máxima de 82 % utilizando isobutanol a 40 °C na razão molar de óleo:álcool (1:6).

A partir dos resultados encontrados neste estudo na transesterificação da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por ligação covalente em tecido de sílica, verificou-se potencial para a produção de ésteres etílicos. Contudo, ainda é necessário o estudo das condições reacionais como temperatura, razão molar óleo:álcool e tipo de álcool, para a obtenção de maiores conversões de ésteres etílicos.

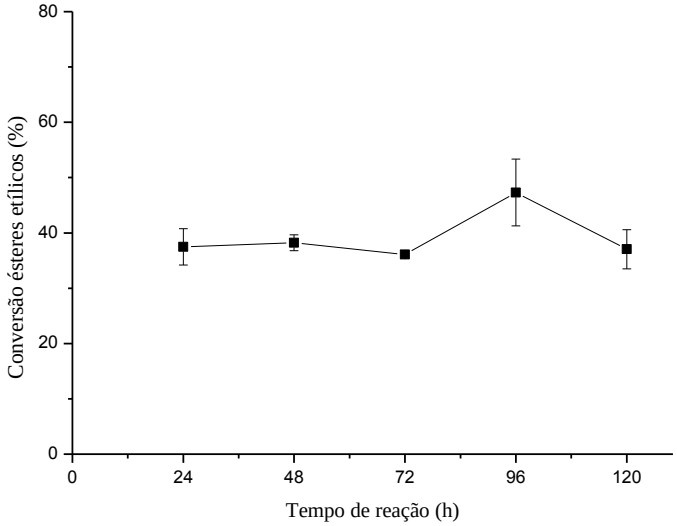

Figura 16. Influência do tempo de reação na conversão de ésteres etílicos (T = 40 °C, razão molar óleo:etanol = 1:7).

3.7. Propriedades morfológicas e físico-químicas

3.7.1. Brunauer – Emmett – Teller (BET)

A Tabela 5 mostra os valores da área superficial específica, volume e diâmetro dos poros do tecido de sílica e biocatalisador imobilizado. A partir dos dados apresentados, observou-se que houve uma redução da área superficial e dos volumes dos poros após a imobilização. Estes resultados confirmam que houve o recobrimento pela lipase nas fibras do tecido, ou seja, a lipase passou a preencher o espaço entre as fibras, aglomerando-as, o que causou a diminuição da área superficial, indicando que a lipase foi imobilizada no tecido de sílica. Salis et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes para imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* em sílica mesoporosa, apresentando uma redução na área superficial de 845 para 620 $m^2\ g^{-1}$, após a imobilização. Em outro estudo, na imobilização da lipase de *Cândida antarctica B* em tecido de carbono, os autores relataram que a área superficial e o volume dos poros

também diminuíram após a imobilização, evidenciando que os poros do tecido foram preenchidos pela lipase (Naranjo et al., 2010).

Tabela 5. Área superficial específica, volume e diâmetro dos poros para o tecido de sílica (TS) e biocatalisador imobilizado (BI) por LC.

Ensaio	Área superficial específica ($m^2\ g^{-1}$)	Volume dos poros ($cm^3\ g^{-1}$)	Diâmetro dos poros (nm)
TS	205,0	0,07	2,8
BI	59,7	0,04	3,5

3.7.2. Medida do ângulo de Contato

A hidrofobicidade foi determinada por meio dos ângulos de contato utilizando os solventes água, formamida e diiodometano. Os valores do ângulo de contato nos fornecem informações sobre a hidrofobicidade da superfície do material, conforme descrito por Araújo et al. (2009).

A Tabela 6 mostra os valores dos ângulos de contato para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado. Segundo Rijnaarts et al. (1995) valores de ângulo superiores a 50° são referentes a superfícies hidrofóbicas e inferiores a esse valor indicam um caráter hidrofílico.

Pode-se notar que houve uma diminuição dos ângulos de contato em relação ao biocatalisador imobilizado, estes resultados indicam que a superfície tornou-se mais hidrofílica, confirmando a presença da lipase no tecido de sílica, o que resultou na diminuição de sua hidrofobicidade. Isto ocorreu devido à ligação dos grupos amina (NH_2) da lipase na superfície do suporte que conferiu um caráter hidrofílico ao biocatalisador imobilizado, ou seja, quando utilizados os solventes formamida e água, que são hidrofílicos, em contato com a superfície do biocatalisador imobilizado, ocorreram interações fortes entre as moléculas de cada líquido e os grupos da superfície do biocatalisador imobilizado, diminuindo assim o ângulo de contato. Já a interação do solvente apolar diiodometano com a superfície do biocatalisador imobilizado não ocorreu, ou seja, as moléculas do líquido interagiram com elas mesmas, diminuindo o contato com a superfície, ocorrendo com isso o aumento do ângulo de contato.

Tabela 6. Medida do ângulo de contato para a superfície do tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC.

Superfície	Água (°)	Formamida (°)	Diiodometano (°)
Tecido de sílica	110,3	69,5	-
Biocatalisador imobilizado	49,0	47,7	25,5

3.7.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a caracterização da morfologia do tecido de sílica e biocatalisador imobilizado foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, conforme apresentado na Figura 6. A micrografia resultante do tecido de sílica está apresentada nas Figuras 17 (a), (b) e (c), nas quais se pode notar que a superfície das fibras inicialmente é lisa. Após a imobilização (Figuras 17 (d), (e) e (f)), observa-se o recobrimento da lipase sobre a superfície das fibras do tecido de sílica, confirmando que a lipase foi imobilizada com sucesso nas fibras do tecido.

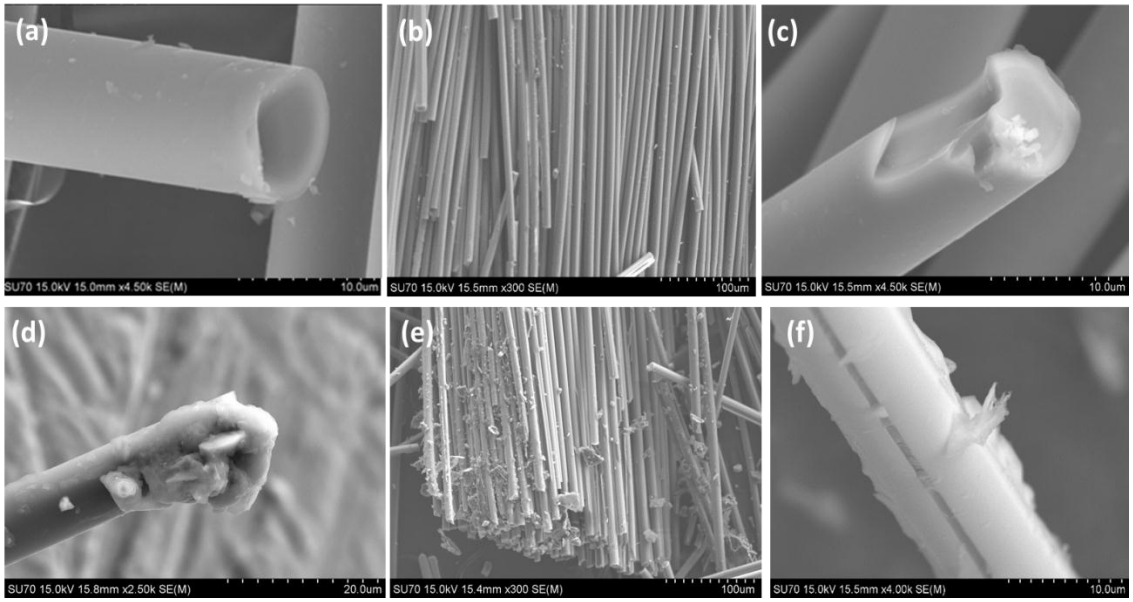

Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura: (a), (b) e (c) tecido de sílica e (d), (e) e (f) biocatalisador imobilizado por LC.

Para identificar a composição química do suporte e biocatalisador imobilizado, foi realizada uma análise de EDS, onde é possível determinar os elementos químicos que estão presentes nos materiais. Na Figura 18a foi possível notar que o tecido de sílica incialmente era composto de sílica (Si) e oxigênio (O). Na Figura 18b referente ao biocatalisador imobilizado verifica-se além da sílica e oxigênio, a presença de carbono,

o que corresponde que a lipase está presente no suporte, comprovando que houve a imobilização.

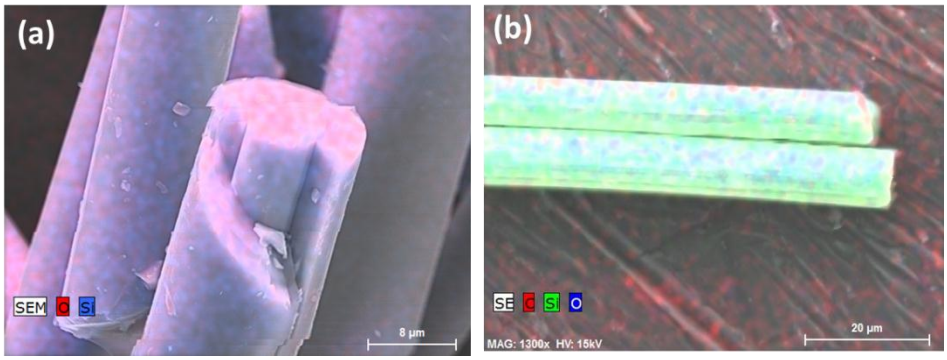

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado à espectroscopia de dispersão de energia (EDS): (a) tecido de sílica e (b) biocatalisador imobilizado por LC.

3.7.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos espectros de FTIR obtidos para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado é apresentada na Figura 19. Todas as amostras apresentaram bandas em torno de 800 - 950 cm^{-1} devido à presença de grupos siloxanos (Si-O-Si) e 1000 – 1100 cm^{-1}, característicos de grupos silanóis (Si-OH) (Zou et al., 2014). De acordo com a literatura a lipase possui duas bandas em 1600 e 1650 cm^{-1} característicos de grupos aminos primários e secundários (Soares et al., 2004). Essas bandas foram observadas no espectro do biocatalisador imobilizado, sugerindo que a imobilização da lipase no tecido de sílica ocorreu.

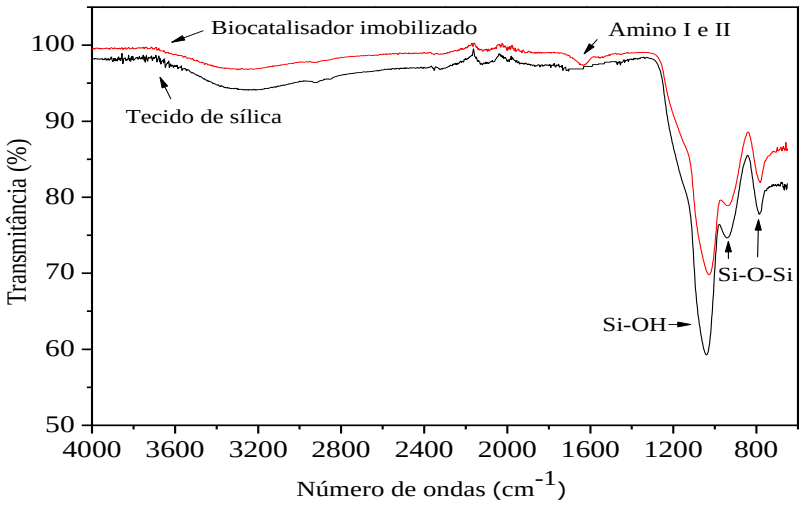

Figura 19. Espectro de FTIR para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC.

3.7.5. Difração de raios X (DRX)

Os dados obtidos por meio de Difração de raios X (DRX) da estrutura do suporte e do biocatalisador imobilizado é mostrado na Figura 20. A partir do difratograma obtido para o tecido de sílica, pode-se notar a presença de picos bem definidos característicos em 2θ = 25° e 2θ = 11°, correspondente a frações cristalinas. De acordo com estudo, este perfil pode estar associado com a presença uma estrutura altamente ordenada feita de um arranjo hexagonal (Salis et al., 2010).

Após o cálculo do Ic (índice de cristalinidade) observou-se um aumento quando este se encontrava em contato com a enzima. O valor do Ic do suporte puro foi 27 %, enquanto que após a imobilização o Ic aumentou para 39 %. Este resultado é devido à presença da lipase no suporte, aumentado refração da sílica no suporte.

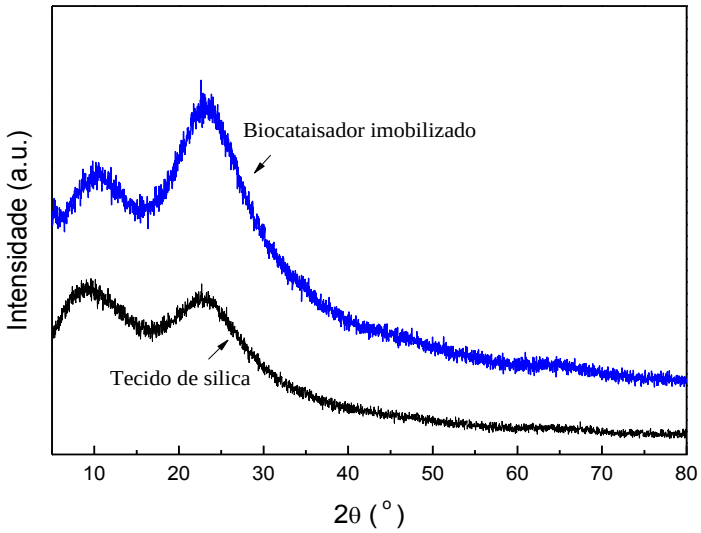

Figura 20. Difratograma de raios X para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC.

3.7.6. Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica mostra o perfil de perda de massa que o material sofre degradação quando submetido a um aquecimento num determinado intervalo de temperatura. A perda total de massa para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado foi de 17,77 e 21,7 %, respectivamente. Os termogramas obtidos para o tecido de sílica e biocatalisador imobilizado são apresentados na Figura 21, e foram divididos em três regiões.

Na Região I, que compreende intervalo de temperatura entre 25 e 200 °C ocorre perda de massa devido à desidratação, correspondente a uma perda de moléculas de água adsorvida sobre a superfície do material (Silva et al., 2013). Na Região II, que correspondente ao intervalo de temperatura de 200 e 600 °C está vinculada com a condensação de grupos silanóis e a decomposição de compostos orgânicos (C, H, O e N) sob a forma de voláteis presentes ou formados no início de decomposição de compostos orgânicos, contendo a lipase (Souza et al., 2013). Na Região III, compreendendo a faixa de temperatura entre 600 e 800 °C houve pouca perda de massa do suporte, pois não teve degradação de composto orgânico, já para o biocatalisador imobilizado a perda de massa foi um pouco maior, a qual está associada com as reações de desidroxilação finais e de carbonização final de compostos orgânicos (Soares et al., 2004b).

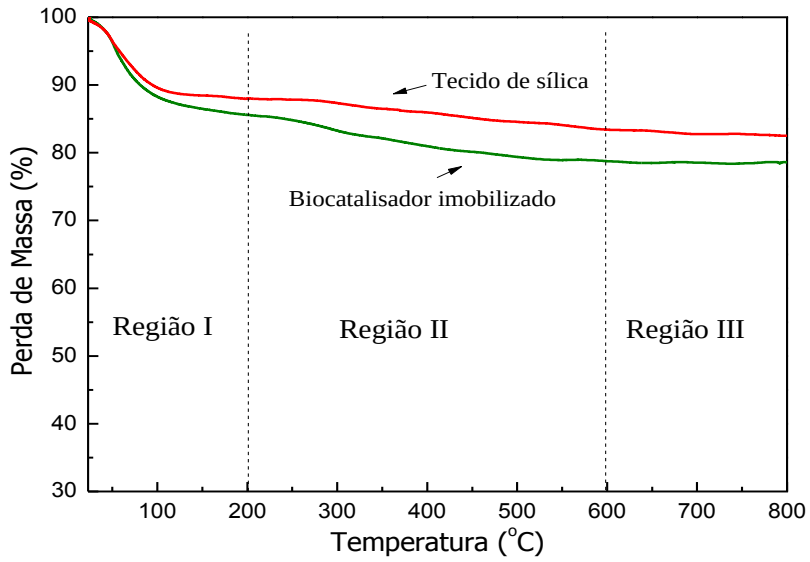

Figura 21. Curvas termogravimétricas do tecido de sílica e biocatalisador imobilizado por LC.

4. CONCLUSÕES

A imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em tecido de sílica foi alcançada com sucesso e foi obtido rendimento de imobilização de 80% através do método de ligação covalente com epicloridrina com carregamento ótimo para enzima imobilizada de $0{,}1 g_{enzima}/g_{suporte}$. O pH e temperatura ótima para o biocatalisador imobilizado foi de 7 e 60 °C, respectivamente. Os parâmetros cinéticos foram: $V_{máx}$ de

79,37 μmol/g.min e K_m de 176,72 mM. A capacidade de reutilização do biocatalisador imobilizado foi de 3 vezes, mantendo 60 % da sua atividade inicial. Na reação de transesterificação foi alcançada uma conversão de 47,31 % de ésteres etílicos com o tempo de reação de 96 h a 40 °C. A imobilização foi confirmada através da caracterização físico-química e morfológica, na qual se pode notar que a lipase se distribui ao longo da superfície do tecido de sílica. Portanto, este trabalho constitui um passo importante a permitir a utilização do tecido como um suporte para imobilização de lipase.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e para a bolsa atribuída a Islânia dos Santos Lima.

REFERÊNCIAS

ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, p. 545–551, 2013.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

ARAÚJO, E. A.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, P. E.; SÁ, J. P. N. Hidrofobicidade de ribotipos de *bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. *Alim. Nutr., Araraquara*, v. 20, n. 3, p. 491-497, 2009.

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. Imobilização de Lipase por Encapsulação em Sílica Aerogel. *Quimica Nova*, v. 37, p. 969-976, 2014.

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M.Y. Immobilization of Mucor miehei esterase on core-shell magnetic beads via adsorption and covalent binding: Application in esters synthesis. *Fibers and Polymers*,15, 2051-2060, 2014.

BRUNAUER , S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 60, p. 309–19, 1938.

CABRERA-PADILLA, R.Y. ; LISBOA, M.C. ; FRICKS, A. T. ; FRANCESCHINI, 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. 39, p. 289-298, 2011.

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.

CHEN B., Yin C., CHENG Y., LI W., CAO Z., TAN T.W. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: the effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass Bioenergy*, 66, p. 39:59, 2012.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v.101, p. 5508–5516, 2010.

FENG, D.A.X.; PATTERSON, M.; BALABAN, E.A.C.; EMANUELSSON. Enabling the utilization of wool as an enzyme support: enhancing the activity and stability of lipase immobilized onto woolen cloth. *Colloid Surf. Biointerfaces*, v. 102, p. 526–533, 2013.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (Orbinya sp). *Process Biochemistry*, v. 44, p.1068-1074, 2009.

GULDHE, A., SINGH, B., MUTANDA, T., PERMAUL, K., BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, v. 27, p.782–798, 2009.

HU, Y.; TANGA, S.; JIANGA, L.; ZOUA, B.; YANGA, J.; HUANGA, H. Immobilization of Burkholderia cepacia lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2291–2299, 2012.

IVETIĆ, D.Z.; SRDIĆ, V.V.; ANTOV, M.G. Immobilization of β-glucosidase onto a mesoporous silica support: physical adsorption and covalent binding of the enzyme. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 79, p. 533–543, 2014.

LI, W.; SHEN, H.; TAO, Y.; CHEN B.; TAN, T. Amino silicones finished fabrics for lipase immobilization: Fabrics finishing and catalytic performance of immobilized lipase. *Process Biochemistry*, v. 49, p. 1488–1496, 2014.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; CASTRO, H.F. 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.

NARANJO, J.C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V.S.; MORENO-PIRAJÁN, J.C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 166–171, 2010.

NARWAL, S. K; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. *Biotechnology Letters*, v. 35, p. 479-490, 2013.

ONDUL, E.; DIZGE,N.;ALBAYRAK, N. Immobilization of *Candida antartica A* and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.95, p. 109–114, 2012.

RIBEIRO, L. M. O.; SILVA, A. E.; SILVA, M. C. S; ALMEIDA, R. M. R. G. A Study on Ethanolysis and Methanolysis of Coconut Oil for Enzymatically Catalyzed Production of Biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 4, p. 215 - 224, 2014.

RIJNAARTS, H.H.M.; NORDE, W.; LYKLEMA, J.; ZEHNDER, A.J.B. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.* 4, p.191 197, 1995.

SALIS, A.; CASULA, M.F.; BHATTACHARYYA, M.S.; PINNA, M.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15: Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance. *ChemCatChem*, v. 2, p. 322 – 329, 2010.

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN JUNIOR, A. E. & CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, v. 29, p.786-794, 1959.

SILVA, J.A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.S.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of Candida antarctica lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 16– 24, 2012.

SILVA, A.L.P.; NASCIMENTO, R.G.; ARAKAKI, L.N.H.; ARAKAKI, T.; ESPÍNOLA, J.G.P.; FONSECA, M.G. Organofunctionalized silica gel as a support for lipase. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 376, p. 139–144, 2013.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. Desempenho da Matriz Híbrida SiO_2-Quitosana na Imobilização da Lipase Microbiana de *Candida rugosa*. *Quimica. Nova*, v. 34, p. 33-38, 2011.

SOARES, C. M. F.; SANTOS O.A., CASTRO, H. F.; MORAES, F.F., ZANIN, G.M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. Applied Biochemistry and Biotechnology, 113, p. 307-319, 2004 (a).

SOARES, C. M. F.; SANTOS O.A., 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(b).

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77, p.745-747, 1999.

SOUZA, R.L.; FARIA, E.L.P; FIGUEIREDO, R.T.; FRICKS, A.T.; ZANIN, G.M.; SANTOS, O.A.A.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Use of polyethylene glycol in the process of sol–gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. *J Therm Anal Calorim*, v. 117, p. 301–306, 2014.

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 liquido as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 141-150, 2013.

UYANIK, A.; SEN, N.; YILMAZ, M. Improvement of catalytic activity of lipase from Candida rugosa via sol–gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown. Bioresource Technology, v. 102, p. 4313– 4318, 2011.

WANG, C.F.; ZHOU, G.; LI, Y.J.; LUA, N.; SONGA, H.; ZHANG, L. Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 406, p. 75– 83, 2012.

YANG, G.; WU, J.; XU, G.; YANG, L. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 78, p. 351–356, 2010.

YOU, Q.; YIN, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Biodiesel production from jatropha oil catalyzed by immobilized Burkholderia cepacia lipase on modified attapulgite. *Bioresource Technology*, v. 148, p. 202–207, 2013.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Thermal stability and energy of deactivation of free and immobilized amyloglucosidase in the saccharification of cassava starch. Applied Biochemistry and Biotechnology, 70-72: p. 383-394, 1998.

ZHANG, B; WENG, Y; XU, H; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 61-70, 2012.

ZOU, B.; HUA, Y.; CUI, F.; JIANG, L.; YU, D.; HUANG, H. Effect of surface modification of low cost mesoporous SiO_2 carriers on the properties of immobilized lipase. *Journal of Colloid and Interface Science, v.* 417, p. 210–216, 2014.

ZUBIOLO, C.; SANTOS, R.C.A.; CARVALHO, N.B.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S.; SANTANA, L.C.L.A. Encapsulation in a sol–gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 37, p. 1781–1788, 2014.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente trabalho são apresentadas a seguir:

- O método de imobilização por ligação covalente em comparação à adsorção física foi mais eficiente, apresentando rendimento de imobilização de 80% com carregamento ótimo para enzima imobilizada de $0{,}1 g_{enzima}/g_{suporte}$;

- Na caracterização bioquímica para os biocatalisadores imobilizados por ligação covalente, o pH e temperatura ótima foram de 7 e 60 °C, respectivamente. Os parâmetros cinéticos foram: $V_{máx}$ de 2500 e 79,37 μmol/g.min para a enzima livre e biocatalisador imobilizado, respectivamente. E o valor de K_m foi de 665 mM para a enzima livre e 176,72 mM para o biocatalisador imobilizado. O biocatalisador imobilizado apresentou ótima resistência à temperatura, exibindo uma melhor estabilidade térmica em comparação a enzima livre, proporcionando para o biocatalisador imobilizado um tempo de meia vida de 33 h. Verificou-se a partir da estabilidade operacional que a lipase de BC imobilizada pode ser reutilizada até 3 vezes, mantendo 60 % da sua atividade inicial;

- Na aplicação do biocatalisador em reação de transesterificação utilizando óleo de coco e etanol, foi obtida uma conversão máxima de 47,31 % com o tempo de reação de 96 h a 40 °C;

- Através da caracterização morfológica e físico-química do biocatalisador imobilizado, pode-se notar a presença da lipase no tecido de sílica, confirmando a imobilização.

Pode-se concluir que os objetivos propostos foram alcançados. Portanto, este trabalho veio contribuir com uma nova proposta de suporte para imobilização de lipase.

CAPÍTULO V

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para complementar os estudos, sugere-se:

- Estudar e avaliar o método de imobilização por ligação covalente multipontual em tecido de sílica para que este apresente uma melhor estabilidade operacional da lipase imobilizada;

- Aplicar o tecido de sílica na configuração de reatores para a síntese de biodiesel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTHY, M.; SARAVANANB,P.; GOWTHAMAN, M.K.; ROSE, C.; KAMINI, N.R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chemical engineering research and design*, v. 92, p. 1591–1601, 2014.

ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M.R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, v. 63, p. 138–148, 2012.

ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, p. 545–551, 2013.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

ARANSIOLA, E.F.; OJUMU, T.V.; OYEKOLA, O.O.; MADZIMBAMUTO, T.F.; IKHU-OMOREGBE, D.I.O. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass and Bioenergy*, v. 61, p. 276 e 297, 2014.

ARAÚJO, E. A.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; FERNANDES, P. E.; SÁ, J. P. N. Hidrofobicidade de ribotipos de *bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. *Alim. Nutr., Araraquara*, v. 20, n. 3, p. 491-497, 2009.

BAI, F.; YAN, W.; ZHANG, S.; YU, D.; BAI, L. Immobilized lipase of reconstructed oil bodies and its potential application in biodiesel production. *Fuel*, v. 128, p. 340–346, 2014.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 1479-1492, 2011.

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. Imobilização de Lipase por Encapsulação em Sílica Aerogel. *Quimica Nova*, v. 37, p. 969-976, 2014.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. 1ª Ed, Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008.

BOUAID, A.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Biorefinery approach for coconut oil valorisation: A statistical study. *Bioresource Technology*, v.101, p. 4006–4012, 2010.

BRUNSCHWIG, C.; MOUSSAVOU, W.; BLIN, J. Use of bioethanol for biodiesel production. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, p. 283-301, 2012.

CABRERA-PADILLA, R.Y. ; LISBOA, M.C. ; FRICKS, A. T. ; FRANCESCHINI, 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. 39, p. 289-298, 2011.

CANILHO, N.; JACOBY, J.; PASC, A.; CARTERET, C.; DUPIRE, F.; STÉBÉ, M. J.; BLIN, J. L. Isocyanate-mediated covalent immobilization of Mucor miehei lipase onto SBA-15 for transesterification reaction. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 112, p. 139–145, 2013.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de Sílicas Modificadas para Imobilização de Lipases. *Química Nova*, v. XY, p. 1-11, 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.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*. v. 23, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química. Nova*, v. 27, p.146-156, 2004.

CHEN B., Yin C., CHENG Y., LI W., CAO Z., TAN T.W. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: the effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass Bioenergy*, 66, p. 39:59, 2012.

CHRISTOPHER, L.P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V.P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, v.119, p. 497–520, 2014.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v.101, p. 5508–5516, 2010.

DE CASTRO, H. F; ZANIN, G. M; MORAES, F. F; SÁ-FERREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S; FERRARA, M. A; CORVO, M. L. Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Ed Interciência; UFRJ: CAPES:FAPERJ, cap. 6, p. 123-151, 2008.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSEB, A. J.; BOHLMANNB,G. Review Industrial use of immobilized enzymes, *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6437-6474, 2013.

DONG, H.; LI, J.; LI, Y.; HU, L.; LUO, D. Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite, *Chemical Engineering Journal*, v. 181, p. 590–596, 2012.

DU W., LI W., SUN T., CHEN X., LIU D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 79, p. 331–337, 2008.

ELNASHAR, M.M.M. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v. 1, p. 61-77, 2010.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Advances*, 31, p. 1808-1825, 2013.

FENG, D.A.X.; PATTERSON, M.; BALABAN, E.A.C.; EMANUELSSON. Enabling the utilization of wool as an enzyme support: enhancing the activity and stability of lipase immobilized onto woolen cloth. *Colloid Surf. Biointerfaces*, v. 102, p. 526–533, 2013.

FUKUDA, H.; KOND0, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 92, p. 405-416, 2001.

GALAN, C.G.; MURCIA, B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUESC, R.C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.*, v. 353, p. 2885 – 2904, 2011.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renewable Energy*, v. 39, p. 10-16, 2012.

GUISAN, J. M. (editor). Immobilization of Enzymes and Cells. 2ª Ed, Totowa-New Jersey: Humana Press, 2006.

GULDHE, A., SINGH, B., MUTANDA, T., PERMAUL, K., BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C.N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, p.171–190, 2013.

GUSTAFSSON, H.; JOHANSSON, E.M.; BARRABINO, A.; ODÉN, M.; HOLMBERG, K. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica—The effect of varied particle size and morphology . *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 100, p. 22–30, 2012.

HARA, P.; HANEFELD, U.; KANERVA, L. T. Sol–gels and cross-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.

HARA, P.; MIKKOLA, J.P.; YU, D.; MURZIN.; 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.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.

HASS, M. J; FOGLIA, T. A. Matérias-primas alternativas e tecnologias para produção de biodiesel. In: KNOTHE, G; GERPEN, J. V; KRAHL, J; RAMOS, L. P. Manual do Biodiesel. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.Cap 4.2 p. 46-66.

HU, Y.; TANGA, S.; JIANGA, L.; ZOUA, B.; YANGA, J.; HUANGA, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2291–2299, 2012.

JEGANNATHAN, K. R.; JUN-YEE, L.; CHAN, E.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in j-carrageenan. *Fuel*, v. 89, p. 2272–2277, 2010.

JERONIMO, C. E. M. Tecnologias limpas aplicadas a gestão dos resíduos do coco. *Revista Qualidade Emergente*, v.3, p. 20-29, 2012.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 555–569, 2012.

KHARRAT, N.; ALI, Y.B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.T.; CHAABOUNI, M.K. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1083–1089, 2011.

KRISHNA A.G. G.; GAURAV R.; BHATNAGAR, A. S.; KUMAR P.K. P.; CHANDRASHEKAR, P. Coconut Oil: Chemistry, Production and Its Applications - A Review. *Indian Coconut Journal*, 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

LI, W.; SHEN, H.; TAO, Y.; CHEN B.; TAN, T. Amino silicones finished fabrics for lipase immobilization: Fabrics finishing and catalytic performance of immobilized lipase. *Process Biochemistry*, v. 49, p. 1488–1496, 2014.

LOPES, D.C.; NETO, A.J.S. Potential Crops for Biodiesel Production in Brazil: A Review. *World Journal of Agricultural Sciences*, v. 2, p. 206-217, 2011.

MARINHO, F. J. L.; GHEYI, H. R.; FERNANDES, P. D.; HOLANDA, J. S.; E FERREIRA NETO, M. Cultivo de coco 'Anão Verde' irrigado com águas salinas. Pesquisa agropecuária brasileira, v.41, p. 1277-1284, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A. A.; CASTRO,H.F.; GIORDANO,R.L.C. Triagem de Suportes Orgânicos e Protocolos de Ativação na Imobilização e Estabilização de Lipase de Thermomyces lanuginosus. *Químca Nova*, v. 36, p. 245-251, 2013.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 78, p. 119–134, 2012.

MENDES, A. A; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação De Quitosana Como Suporte Para A Imobilização De Enzimas De Interesse Industrial. *Química. Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011.

MICHELIN, S.; PENHA, F. M.; SYCHOSKI, M. M.; SCHERER, R. P.; TREICHEL, H.; VALERIO, A.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of ultrasound-

assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. *Renewable Energy*, v. 76, p. 388 – 393, 2015.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*, v. 115, p. 126–135, 2012.

MOUNGUENGUI, R.W.M.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 39, p. 441-456, 2013.

NARANJO, J.C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V.S.; MORENO-PIRAJÁN, J.C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 166–171, 2010.

NARWAL, S. K; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. *Biotechnology Letters*, v. 35, p. 479-490, 2013.

NURFITRI, I.; MANIAM, G.P.; HINDRYAWATI, N.; YUSOFF, M.M.; GANESAN, S. Potential of feedstock and catalysts from waste in biodiesel preparation: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 74, p. 395–402, 2013.

PALOMO, J. M; FERNANDEZ-LORENTE, G; MATEO, C; SEGURA, R. L; ORTIZ, C; FERNANDEZ-LAFUENTE, R; GUISAN, J. M. Purification, immobilization, hiperactivation, and stabilization of lipase by selective adsorption on hidrophobic supports. In: GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes and cells 2nd ed. Madrid: Humana Press, 2006. Cap 13, p.130-143.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais, *Química. Nova*, v. 29, p. 93-99, 2006.

OLIVEIRA, M. V. S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M.F.; LIMA, A. L. 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, p. 445-451, 2014.

ONDUL, E.; DIZGE,N.;ALBAYRAK, N. Immobilization of *Candida antartica A* and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.95, p. 109–114, 2012.

RIBEIRO, L. M. O.; SILVA, A. E.; SILVA, M. C. S; ALMEIDA, R. M. R. G. A Study on Ethanolysis and Methanolysis of Coconut Oil for Enzymatically Catalyzed Production of Biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, v. 4, p. 215 - 224, 2014.

SCHMID, A.; DORDICK, J.; HAUER, A.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, v. 409, p. 258-268, 2001.

SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.;

DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, v.5, p. 187-202, 1997.

SHAHID, E.M.; JAMAL, Y.J. Production of biodiesel: A technical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.15, p. 4732– 4745, 2011.

SHELDON, R.A.; PELT, S.V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev*., v. 42, p. 6223, 2013.

SHU, C.; CAI, J.; HUANG, L.; ZHU, X.; XU, Z. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, p. 139–144, 2011.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. Desempenho da Matriz Híbrida SiO_2-Quitosana na Imobilização da Lipase Microbiana de *Candida rugosa*. *Quimica. Nova*, v. 34, p. 33-38, 2011.

SOUZA, R.L.; FARIA, E.L.P; FIGUEIREDO, R.T.; FRICKS, A.T.; ZANIN, G.M.; SANTOS, O.A.A.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Use of polyethylene glycol in the process of sol–gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. *J Therm Anal Calorim*, v. 117, p. 301–306, 2014.

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 liquido as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 141-150, 2013.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Tradução atual por Roberta Marchiori Martins. 8ª Ed, Porto Alegre: Artmed, 2008.

VENTURA, D.A.M.F.; ALVES, K.B.; SANTOS, M.K.V.A. Análise comparativa entre o biodiesel de girassol e o biodiesel de mamona. Congresso brasileiro de mamona & simpósio internacional de oleaginosas energéticas, v. 1, p. 7-12, 2010.

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

WANG, Y.; JIANG, X.P.; LI, Y.; ZENG, S.; ZHANG, Y.W. Preparation Fe_3O_4@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from Thermomyces lanuginosus. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.75, p. 44–50, 2015.

YUSUF, N.N.A.N.; KAMARUDIN, S.K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 2741–2751, 2011.

ZARCULA, C.; CROITORU, R.; CORICI, L.; CSUNDERLIK, C.; PETER, F. Improvement of lipase catalytic properties by immobilization in hybrid matrices. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v.52, p. 179-184, 2009.

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

ZHANG, B; WENG, Y; XU, H; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 61-70, 2012.

ZHANG, K-P.; LAI, J-Q.; HUANG, Z-L.; YANG, Z. *Penicillium* expansum lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 2767–2772, 2011.

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.

ZOU, B.; HUA, Y.; CUI, F.; JIANG, L.; YU, D.; HUANG, H. Effect of surface modification of low cost mesoporous SiO_2 carriers on the properties of immobilized lipase. *Journal of Colloid and Interface Science, v.* 417, p. 210–216, 2014.