

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**POTENCIAL PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE INTERESSE
INDUSTRIAL UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM SÍLICA
AEROGEL MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO**

Autor: Milena Chagas Lisboa.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Cleide Mara Faria Soares.

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

POTENCIAL PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE INTERESSE INDUSTRIAL UTILIZANDO
LIPASE IMOBILIZADA EM SÍLICA AEROGEL MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO

Milena Chagas Lisboa

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.^a. Cleide Mara Faria Soares

UNIT/PEP

Dr. Álvaro Silva Lima

UNIT/PEP

Dr. Ranyere Lucena de Souza

UNIT/PEP

Dr.^a. Lisiane dos Santos Freitas

UFS/IQ

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

L769p Lisboa, Milena Chagas
Potencial produção de ésteres de interesse industrial utilizando lipase
imobilizada em sílica aerogel modificada com líquido iônico / Milena Chagas
Lisboa ; orientação [de] Prof.ª Dr.ª Cleide Mara Faria Soares, Prof.ª Dr. Álvaro
Silva Lima – Aracaju: UNIT, 2018.

117 f. : 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes,
2018
Inclui bibliografia.

1. Lipase. 2. Aerogel. 3. Líquido iônico. 4. ésteres etílicos. 5. Palmito de cetila. I.
Lisboa, Milena Chagas. II. Soares, Cleide Mara Faria (orient.). III. Lima, Álvaro
Silva. IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 602.1: 661.726

Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.

Jean Cocteau

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a minha família, minha mãe Eliúde, meu pai Napoleão e meu irmão Thiago por toda compreensão, carinho e amor, assim como aos meus amigos de uma vida inteira Célia, meu primo Lucas, Giselle, Bruno, Monise, Joka, Ju, Babi, Xavier e Marcel.

Aos meus novos amigos que me apoiaram bastante, meu muito obrigada Wilson, Tamara, Vitor Anfrízio, Danilo Supreme, Fabi, Paula, Kênia e Lídia.

Aos meus orientadores Prof Cleide e Prof Álvaro, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio incondicional nas minhas atividades acadêmicas, e, em especial à Prof. Cleide por toda paciência e carinho;

Ao meu cachorrinho Lupy, que infelizmente deixou a minha casa e o meu coração mais solitário no início de 2018, te amo para sempre querido. Agradeço também ao Prof. Ranyere, que graças a ele poderei adotar a minha nova cadelinha, Murphy, que apesar de ainda não conhecer, sua existência já me trouxe bastante paz;

À Prof. Rebeca que me deu uma experiência de “introdução ao mestrado” durante a iniciação científica, facilitando bastante a meu aprendizado;

Ao César, aluno de iniciação científica que vem me acompanhando por pelo menos um ano, obrigada pelo interesse e boa vontade de aprender, espero está fazendo por você algo que já fizeram por mim. E também ao Daniel, que começou a me acompanhar há alguns meses, muito obrigada.

À Prof. Lisiane (UFS) por conceder o uso do GC-MS em momentos de grande necessidade, assim como também ao Prof. Elton e seus alunos Manu, Klebson e Roney (NUESC), por me ensinarem e concederem o uso da unidade de extração supercrítica;

Ao Adriano e Ernandes (que não me deixam chamar de Prof.) por terem me recebido tão amavelmente na Universidade federal de Alfenas-MG, por todo ensinamento, amizade e diversão;

Aos meus colegas/amigos de laboratório do LPA, LEB e LAM, onde juntos formamos uma segunda casa, uma segunda família, principalmente depois do Sinaferm 2017. Muito obrigada pela paciência e companheirismo.

E finalmente, à banca examinadora pelos comentários, sugestões e correção da dissertação;

À FAPITEC/SE e a CAPES pelo apoio financeiro. E a todos que acreditaram e confiaram na concretização do meu trabalho. Muito obrigada!

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.

POTENCIAL PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE INTERESSE INDUSTRIAL UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM SÍLICA AEROGEL MODIFICADA COM LÍQUIDO IÔNICO

Milena Chagas Lisboa

O presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* por adsorção física em aerogel modificado com líquido iônico (Aerogel-LI) utilizando modelos matemáticos de adsorção, e avaliar o seu potencial na produção de ésteres de interesse industrial. Afim de avaliar a modificação com Líquido Iônico no Aerogel, foram realizadas as mesmas análises para o aerogel sem modificação (Aerogel-Controle) nas reações de hidrólise, transesterificação e esterificação. O carregamento de lipase na reação de hidrólise de azeite de oliva foi selecionado 297 mg/g_{suporte} para o Aerogel-Controle de acordo com o modelo de Redlich-Perterson, enquanto que para o Aerogel-LI foi 337 mg/g_{suporte} conforme o ajuste do modelo de Sips. Na imobilização por adsorção física para ambos os biocatalisadores, foi observado que a partir da análise da energia livre de Gibbs o processo ocorreu de forma espontânea e em sentido favorável. A temperatura ótima do meio reacional foi 40°C e o pH ótimo foi 7 para ambos os biocatalisadores imobilizados em Aerogel-Controle (BI-Controle) e em Aerogel-LI (BI-LI). O biocatalisador imobilizado apresentou um aumento em sua velocidade reacional (de 681,24 para 891,87 U/g) a partir da modificação do suporte com LI (BI-Controle e BI-LI, respectivamente). Na estabilidade térmica verificou-se a hiperativação após 8 dias de incubação em meio aquoso à 40°C para o BI-LI, enquanto que o BI-Controle e a enzima livre inativaram. O potencial de produção de ésteres de interesse industrial foi avaliado a partir da reação de transesterificação do óleo de coco bruto e etanol e da esterificação do palmitato de cetila com o álcool cetílico. A conversão máxima de ésteres etílicos foi de 70% (144h a 40°C) utilizando o BI-LI após a sua otimização. Os valores mais promissores foram na síntese de palmitato de cetila cuja a conversão máxima foi 100%. O palmitato de cetila bruto demonstrou ter um bom potencial emulsificante frente ao óleo de coco virgem demonstrando comportamento de emulsões de Pickering, abrindo novas perspectivas para sua aplicação na indústria de cosméticos.

Palavras-chave: lipase, aerogel, adsorção, líquido iônico, ésteres etílicos, palmitato de cetila.

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.)

PRODUCTION OF ESTERS OF INDUSTRIAL INTEREST USING LIPASE
IMMOBILIZED IN AEROGEL MODIFIED WITH IONIC LIQUID

Milena Chagas Lisboa

The aim of the present work was to optimize the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase by physical adsorption in aerogel modified with ionic liquid (Aerogel-IL) using adsorption mathematical models, and to evaluate its potential in the production of industrial interest esters. In order to evaluate the modification with Ionic Liquid on Aerogel, the same analyzes were carried out for aerogel without modification (Aerogel-Control) in the reactions of hydrolysis, transesterification and esterification. The loading of lipase in the hydrolysis reaction of olive oil was selected $297 \text{ mg.g}_{\text{support}}^{-1}$ for Aerogel-Control fitting according to Redlich-Perterson model, while for the Aerogel-IL it was $337 \text{ mg.g}_{\text{support}}^{-1}$ adjusted according to Sips model. In the immobilization by physical adsorption for both biocatalysts, was observed from Gibbs free energy analysis that the process occurred spontaneously and in a favorable direction. The optimum temperature of the reaction media was 40°C and the optimum pH was 7 for both biocatalysts immobilized in Aerogel-Control (IB-Control) and Aerogel-IL (IB-IL). The immobilized biocatalyst showed an increase in its reaction rate (from 681.24 to 891.87 U.g^{-1}) from the modification of the support with IL (IB-Control and IB-IL, respectively). In thermal stability, hyperactivation was observed after 8 days of incubation in aqueous medium at 40°C for IB-IL, while IB-Control and free enzyme inactivated. The potential production of industrial interest esters was evaluated from the transesterification reaction of crude coconut oil and ethanol and in the esterification of cetyl palmitate with cetyl alcohol. The maximum conversion of ethyl esters was 70% (144 h at 40°C) using IB-IL after their optimization. The most promising result were in the synthesis of cetyl palmitate whose maximum conversion was 100%. The crude cetyl palmitate showed a good emulsifier potential against virgin coconut oil demonstrating the behavior of Pickring emulsions, opening new perspectives for its application in the cosmetics industry.

Keywords: lipase, aerogel, adsorption, ionic liquid, ethyl esters, cetyl palmitate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	4
3.1. ENZIMAS.....	4
3.1.1. <i>Lipase</i>	6
3.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	9
3.2.1. <i>Adsorção Física</i>	12
3.2.2. <i>Ligação Covalente</i>	15
3.2.3. <i>Encapsulamento</i>	17
3.3. SÍLICA AEROGEL.....	18
3.4. REAÇÕES CATALÍTICAS DE SÍNTESE DE INTERESSE INDUSTRIAL.....	25
3.4.1. <i>Produção de ésteres etílicos</i>	26
3.4.2. <i>Produção de ésteres de cera</i>	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	30
4.1. MATERIAIS.....	30
4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	30
4.2.1. <i>Produção do aerogel</i>	32
4.2.2. <i>Imobilização por adsorção física</i>	35
4.2.3. <i>Métodos analíticos</i>	35
4.2.4. <i>Caracterização bioquímica na hidrólise</i>	38
4.2.5. <i>Produção de ésteres etílicos</i>	39
4.2.6. <i>Produção de palmitato de cetila</i>	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
5.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO FÍSICA.....	42
5.1.1. <i>Recuperação da atividade</i>	43
5.1.2. <i>Efeito da carga enzimática inicial: Isotermas de adsorção e estudo termodinâmico</i>	45

5.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO BIOCATALISADOR IMOBILIZADO POR ADSORÇÃO FÍSICA	51
5.2.1. <i>Estudo de pH e temperatura ótima</i>	51
5.2.2. <i>Estabilidade térmica</i>	53
5.2.3. <i>Determinação Parâmetros cinéticos na hidrólise do azeite de oliva</i>	56
5.3. REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS	57
5.4. REAÇÕES DE SÍNTESE DE PALMITATO DE CETILA.....	63
5.4.1. <i>Atividade Emulsificante</i>	74
6. CONCLUSÕES.....	79
7. TRABALHOS FUTUROS.....	81
8. LISTA DE DIVULGAÇÃO.....	82
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	83
ANEXO 1	98
ANEXO 2	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comportamento cinético de duas enzimas distintas. Fonte: WILSON e WALKER (2010) e DUTTA (2008), com adaptações	5
Figura 2. Diagrama topológico estrutural da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> . Fonte: KIM <i>et al.</i> (1997)	8
Figura 3. Transição conformacional da LBC, encontrando-se com tampa fechada na etapa A e gradualmente abrindo a tampa do sítio ativo, na cor azul, após 30ns de fornecimento de tolueno. (A) no início; (B) depois de 3ns; (C) 7 ns; (D) 10 ns; (E) 17 ns. Fonte: TRODLER <i>et al.</i> (2009), com modificações.....	9
Figura 4. Ilustração generalizada sobre os principais parâmetros utilizados para a imobilização enzimática. Fonte: CAO <i>et al.</i> , (2005), com modificações.....	10
Figura 5. Principais métodos de imobilização de enzimas. Fonte: IQBAL <i>et al.</i> (2013), com modificações.....	12
Figura 6. Esquema da funcionalização e a ativação de suportes inorgânicos durante a imobilização covalente multipontual (funcionalização com grupos -NH ₂ e a ativação com brometo de cianogênio é relatado como um exemplo). Fonte: SHELDON e VAN PELT (2013)	16
Figura 7. Representação esquemática do processo de crescimento de nanopartículas de sílica pura a partir de TEOS. Fonte: ZHANG <i>et al.</i> (2014), com modificações.....	18
Figura 8. Tipos de secagem da Sílica. Fonte: GARCÍA-GONZÁLEZ <i>et al.</i> (2012), com modificações.....	19
Figura 9. Reação de transesterificação com estruturas moleculares generalizada dos compostos. Fonte: SIMONETTI <i>et al.</i> , (2014) e RUHUL <i>et al.</i> , (2015) (com modificações).....	27
Figura 10. Demonstração da fisiologia da baleia cachalote. Fonte: CLARKE (1978), com modificações.....	28
Figura 11. Reação de esterificação do palmitato de cetila. Fonte: MUTLU e YILMAZ (2016), com modificações	29
Figura 12. Esquema representativo das etapas envolvidas neste estudo.....	31
Figura 13. Aparato experimental para a formação da matriz sol-gel e a sua modificação com líquido iônico.....	33

Figura 14. Equipamento utilizado para a consecução dos experimentos de secagem do sol-gel empregando CO ₂ pressurizado. Fonte: BARBOSA <i>et al.</i> , (2014), com algumas modificações.....	34
Figura 15. Aparato experimental para execução da imobilização da LBC em aerogel por ligação covalente.	35
Figura 16. Demonstração do decréscimo da eficiência de imobilização com o aumento da carga de enzima no processo de imobilização por adsorção física.....	43
Figura 17. Modelos isotérmicos de adsorção para a adsorção da LBC em aerogel (a) e em aerogel modificado com líquido iônico (b).	47
Figura 18. Relação entre o fator de separação (R_L) e a concentração inicial de lipase (C_0) ...	49
Figura 19. Teste de variação de pH reacional na hidrólise do azeite de oliva para a LBC imobilizada em aerogel e em aerogel modificado com líquido iônico.....	51
Figura 20. Influência da variação da temperatura na atividade de hidrólise da LBC imobilizada em aerogel (controle) e em aerogel-LI	53
Figura 21. Estabilidade térmica de LBC livre e imobilizado em aerogel com (BI-LI) e sem modificação (BI-Controle) a 40 °C em diferentes tempos de incubação.	54
Figura 22. Atividade hidrolítica da LBC imobilizada em aerogel (BI-Controle) e em aerogel-LI (BI-LI) em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/água (37°C, pH 7,0).....	57
Figura 23. Efeito do tempo reacional na transesterificação do óleo de coco e álcool etílico na razão molar (1:7) a 40°C com 20% m/m de biocatalisador (BI-Controle; BI-LI; BI-LI-OTM).....	58
Figura 24. Triagem para seleção de tempo reacional no estudo da biossíntese de palmitato de cetila utilizando o BI-Controle e BI-LI-OTM.	64
Figura 25. Superfícies de resposta para cada biocatalisador estudado.	70
Figura 26. Estudo cinético da produção de palmitato de cetila utilizando o ponto de maior conversão (Ensaio 7, BI-LI-OTM).	72
Figura 27. Cristalização da região emulsionada pelo palmitato de cetila em óleo de coco virgem.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores que influenciam o desempenho de um sistema de enzima imobilizada.....	11
Tabela 2. Descrição dos principais modelos de isothermas aplicados no estudo do comportamento da enzima na superfície do suporte.	13
Tabela 3. Prospecção acadêmica referente a pesquisa utilizando aerogel aplicado na tecnologia de imobilização de enzimas em ordem cronológica.	22
Tabela 4. Possibilidades de aplicações industriais das lipases seguido de mecanismo reacional e produto ou processo alvo	25
Tabela 5. Codificação das variáveis para elaboração da matriz do planejamento proposto....	40
Tabela 6. Influência da carga inicial de lipase sobre a atividade hidrolítica e os valores aparentes da energia livre de Gibbs para a adsorção física da LBC em partículas de aerogel e em aerogel modificado com líquido iônico.....	46
Tabela 7. Determinação dos parâmetros isotérmicos da adsorção da LBC no aerogel modificado com líquido iônico (Aerogel-LI) e no Aerogel-Controle a 25°C.	48
Tabela 8. Parâmetros cinéticos da LBC imobilizada em aerogel e em aerogel -LI.....	57
Tabela 9. Prospecção acadêmica em ordem cronológica da produção de biodiesel por via enzimática utilizando óleo de coco.....	61
Tabela 10. Experimentos de Síntese de pamitato de cetila pelo biocatalisador controle e pelo biocatalisador modificado com líquido iônico	65
Tabela 11. Análise Estatística para a Síntese de Palmitato de cetila pelo BI-Controle.....	67
Tabela 12. Análise Estatística para a Síntese de Palmitato de cetila pelo BI-LI-OTM.....	68
Tabela 13. ANOVA para a Síntese de palmitato de cetila pelo BI-Controle	69
Tabela 14. ANOVA para a Síntese de palmitato de cetila pelo BI-LI-OTM	69
Tabela 15. Demonstrativo das condições reacionais ótimas para síntese de palmitato de cetila por esterificação já reportadas na literatura.....	73
Tabela 16. Demonstração do decaimento da emulsão formada pelo Hexano/Tween 40, Hexano/Triton X-100 e Hexano/palmitato de cetila incubados a 50°C	75
Tabela 17. Demonstração do decaimento da emulsão formada pelo Óleo de coco virgem /Tween 40, Óleo de coco virgem /Triton X-100 e Óleo de coco virgem /palmitato de cetila	75
Tabela 18. Demonstração do decaimento da emulsão formada pelo Óleo de coco bruto/Tween 40, Óleo de coco bruto/Triton X-100 e Óleo de coco bruto/palmitato de cetila	76

LISTA DE SÍMBOLOS

- [S]: Concentração do substrato;
- A: Altura emulsionada (cm);
- AE_{a/o}: Atividade emulsificante água em óleo (UE/g);
- Aerogel-Controle: Sílica não modificada secada com fluido supercrítico;
- Aerogel-LI: Sílica-LI secada com fluido supercrítico;
- ANOVA: Análise de variância;
- a_S: Constante de Sips (mL/U);
- AS: Equilíbrio entre as moléculas adsorvidas na superfície do sólido (S) e nas moléculas que estão na fase líquida (A);
- Asp: Ácido aspártico;
- b: Expoente (adimensional) de Redlich–Peterson;
- BI-Controle: LBC imobilizada por adsorção física em Aerogel-Controle;
- BI-LI: LBC imobilizada por adsorção física em Aerogel-LI;
- BI-LI-OTM: LBC imobilizada por adsorção física em Aerogel-LI no carregamento proposto na etapa de otimização da adsorção física utilizando diferentes modelos matemáticos;
- B_S: Expoente (adimensional) de Sips;
- C₀: Concentração inicial de adsorvato (mg/mL);
- C_e: Concentração de enzima residual no sobrenadante após a adsorção (U/mL);
- CG: Cromatografia gasosa;
- CLEA: Cross-linked enzyme aggregates/ agregados de enzima por ligação cruzada;
- D: Diluição da amostra em água;
- DG: Diglicerídeos;
- DOE: Planejamento experimental, do inglês *design of experiments*;
- E: Relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total;
- E1: Enzima 1;
- E2: Enzima 2;
- EMR: Erro médio relativo;
- Glu: Ácido glutâmico;
- His: Histidina;
- HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência;
- IUMB: União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular;

K_a : Taxa constante de adsorção;
 K_c : Constante do equilíbrio de adsorção;
 K_d : Taxa constante de dessorção;
 K_F : Constante de Freundlich (U/g);
 K_L : Constante de Langmuir (mL/U);
 K_m : Constante de Michaelis-Menten
 K_{mE1} : Constante de afinidade para a enzima 2;
 K_{mE2} : Constante de afinidade para a enzima 1;
 K_{RP} : Constante de Redlich–Peterson (mL/U);
 K_S : Constante de Sips (mL/U);
LBC: Lipase de *Burkholderia cepacia*;
LCALB: Lipase *Candida Antarctica B*;
LCR: Lipase *Candida rugosa*;
LI: Líquido iônico;
Lipozyme: Lipase *Candida antarctica* imobilizada comercialmente;
LIs: Líquidos iônicos;
LPP: Lipase *pancreática do porco*;
LTL: Lipase *Thermomyces lanuginosus*;
 m : Massa de enzima livre ou imobilizada (pó) (mg);
MG: Monoglicerídeos;
 n : Expoente de Freundlich (adimensional);
 N : Número de amostras;
 N_{KOH} : Normalidade da solução de KOH (N);
PB: Percentual de biocatalisador oferecido no meio reacional (%m/m)
PGA: Penicilina G amidase;
 Q_e : Capacidade de adsorção no equilíbrio (U/g);
 Q_{max} : Capacidade máxima de adsorção do suporte (U/g);
 Q_t^{calc} : Carregamento calculado pelo ajuste dos modelos matemáticos da lipase imobilizada no suporte;
 Q_t^{exp} : Carregamento obtido experimentalmente da lipase imobilizada no suporte;
 R : Constante universal dos gases (8.314 J/mol K);
 R^2 : Coeficiente de correlação;
 R_L : Fator de separação (constante adimensional);

RM: Razão molar (mol de ácido: mol de álcool)

Ser: Serina;

Sílica-LI: Sílica modificada com líquido iônico;

T: Temperatura reacional ($^{\circ}\text{C}$)

t: Tempo de reação (min);

T_{ab} : Temperatura absoluta (298,15K);

TEOS: Tetraetilortossilicato;

u: Teor de umidade do meio.

U_0 : Unidades de atividade oferecidas para a imobilização;

Us: Unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa de biocatalisador imobilizado – base seca);

v: Velocidade reacional;

V_0 : Volume gasto de NaOH na titulação do branco (mL);

V_A : Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

v_a : Volume da amostra emulsificada (mL);

V_B : Volume do KOH gasto na titulação do controle (mL);

V_E : Volume gasto de NaOH na titulação na amostra com enzima (mL).

V_{max} : Valor máximo da velocidade inicial quando todos os sítios ativos estão ocupados,

α : Constante de Redlich–Peterson (1/U);

ΔG : Energia livre de Gibbs (kJ/mol);

1. INTRODUÇÃO

A sustentabilidade é um dos fatores a ser considerado mediante a implementação de um novo processo industrial. Com o aumento da demanda por ésteres obtidos naturalmente ou por processos biotecnológicos, para aplicações na indústria cosmética, farmacêutica e de biocombustível se faz necessário o desenvolvimento de catalisadores altamente específicos (MULHOLLAND *et al.*, 2000). A biocatálise desempenha um papel importante entre os vários ramos da indústria, possuindo altos níveis de estereosseletividade, minimizando a formação de subprodutos, reduzindo o consumo de energia e tendo baixo impacto ambiental, adequando-se às regras da Química Verde (CHOI *et al.*, 2015). As enzimas são biocatalisadores que atuam eficientemente sob condições suaves necessárias para preservar a funcionalidade e integridade dos sistemas biológicos, sendo capazes de aceitar uma vasta variedade de moléculas complexas como substratos para obtenção de diferentes produtos (SCHMID *et al.*, 2001; ILLANES e ALTAMIRANO 2008).

Entre as enzimas, as lipases são amplamente utilizadas por ter a função biológica de catalisar a hidrólise de ésteres e a reação reversa, como a esterificação e a transesterificação (VILLENEUVE *et al.*, 2000; VAN DEN BROEK e BOERIU 2013). No entanto, a sua aplicação é frequentemente limitada pela sua sensibilidade à temperatura e pelas dificuldades encontradas na sua estabilização em meios reacionais, como na sua recuperação e no seu uso sucessivo por longos períodos. Deste modo, a imobilização de enzimas em suportes sólidos está entre os métodos mais eficazes para melhorar sua estabilidade, separação e reutilização (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013; MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização da lipase pode ser realizada de diferentes métodos, a adsorção física é uma técnica simples e econômica, e em alguns casos verificou-se ser o mais adequado para imobilização de lipase em larga escala. A modelagem do equilíbrio de adsorção da lipase em diferentes suportes fornece uma abordagem mais confiável do que os métodos "aleatórios" que indicam informações experimentais apenas no sistema investigado (ALVES *et al.*, 2017, FOO e HAMEED, 2010). Até então, vários materiais são utilizados como suporte na imobilização da lipase, como as resinas poliméricas, celite, sílica, cerâmica, nanotubos de carbono, partículas magnéticas e microesferas (BIROLI *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2013).

A sílica obtida pela técnica sol-gel permite controlar o tamanho do poro e as propriedades da superfície, de modo a promover um ambiente apropriado para a imobilização (CARVALHO *et al.*, 2014). Dependendo do método utilizado para extrair o fluido do poro do gel úmido da sílica, um sólido com porosidade variável pode ser obtido. Utilizando o fluido supercrítico como procedimento de secagem da sílica obtém-se o Aerogel, que supera os problemas encontrados com os métodos de secagem convencionais associados a tensão interfacial, tais quais a evaporação (Xerogel), preservando a elevada porosidade e propriedades texturadas superiores da sílica (SCHULTZ *et al.*, 2005).

A modificação da superfície da sílica com grupos hidrofóbicos vem resultando em uma maior capacidade de carga e melhor estabilidade transformando em um suporte altamente hidrofóbico, proporcionando excelentes propriedades para interagir tanto com a tampa hidrofóbica da lipase como com os substratos (MENAA *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2014). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa confirmam que a sílica modificada com líquido iônico prótico (Sílica-LI) de característica mais hidrofóbica (Pentanoato de N-metil monoetanolamina) e aplicada no protocolo de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) apresentaram valores promissores (SOUZA *et al.*, 2013). A partir desta perspectiva, avaliou-se o processo secagem da Sílica-LI com fluido supercrítico para obtenção do aerogel modificado com líquido iônico (Aerogel-LI) e assim, aplica-lo na imobilização da LBC utilizando diferentes métodos, verificando que por adsorção física obtém-se um biocatalisador com maior rendimento de imobilização (BARBOSA *et al.*, 2016).

O maior rendimento de imobilização deve-se possivelmente a característica hidrofóbica do líquido iônico e a elevada área superficial e volume de poro proporcionada pela a modificação do aerogel. Desta forma, o Aerogel-LI é um suporte promissor para a imobilização da LBC por adsorção física tendo vistas à necessidade de estudos complementares quanto a otimização do processo de imobilização e aplicação na síntese orgânica de ésteres de interesse industrial, destacando-se a produção de ésteres etílicos na indústria de biocombustíveis e a síntese de ésteres de cera com aplicação na indústria de cosméticos. Ambos são uma boa alternativa na minimização de impactos ambientais, pois a síntese de biodiesel utilizando um óleo sem refino (óleo cru) diminui a quantidade de operações unitárias envolvidas no processo, liberando menos poluentes ao meio ambiente. Enquanto que o palmitato de cetila é um tipo de éster de cera de difícil extração da natureza, uma vez sendo encontrado apenas no espermacete da baleia cacholote (espécie protegida contra exploração) e no óleo de jojoba (cultivo restrito ao ambiente desértico). Portanto, a

potencial produção destes ésteres utilizando biocatálise é uma boa alternativa para minimização de impactos ambientais associados a catalisadores químicos, tais quais a temperatura reacional elevada e a produção de subprodutos tóxicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* em aerogel e em aerogel modificado com líquido iônico e avaliar o seu potencial na produção de ésteres etílicos e palmitato de cetila.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o processo de adsorção da lipase *Burkholderia cepacia* em aerogel e em aerogel modificado com líquido iônico (Pentanoato de N-metil monoetanolamina) através de isothermas de adsorção e estudo termodinâmico e assim, escolher o carregamento para a imobilização utilizando como parâmetro a reação de hidrólise de azeite de oliva;
- Realizar a caracterização bioquímica dos biocatalisadores imobilizados na reação de hidrólise do azeite de oliva (pH e temperatura ótimas, estabilidade térmica, estudo cinético);
- Realizar a avaliação da modificação com líquido iônico no biocatalisador quando aplicado à síntese orgânica por diferentes mecanismos reacionais (transesterificação e esterificação);
- Realizar o estudo preliminar para a produção de ésteres etílicos por transesterificação do óleo de coco bruto e etanol utilizando o biocatalisador modificado com líquido iônico;
- Avaliar as condições selecionadas na síntese de palmitato de cetila por esterificação do ácido palmítico e álcool cetílico aplicando os biocatalisadores preparados;
- Avaliar o potencial emulsificante do palmitato de cetila sintetizado na melhor região de trabalho utilizando diferentes substratos.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Neste capítulo será apresentado brevemente os conceitos de biocatálise, imobilização, otimização por isoterma de adsorção, bem como a aplicação de biocatalisadores na síntese de ésteres etílicos e ésteres de cera, além de apresentar a relevância da secagem da sílica utilizando fluido supercrítico e da modificação de sua superfície com líquido iônico, para agir como suporte na imobilização de enzimas.

3.1. Enzimas

O papel das enzimas em uma variedade de processos vem sendo reconhecido em muitos anos, a sua existência foi associada com a história da Grécia antiga onde se usavam enzimas provenientes de micro-organismos na panificação, na fabricação de cerveja, na produção do álcool, na fabricação de queijos e etc. A partir da evolução do conhecimento humano, trazendo consigo tecnologias, como por exemplo, de purificação de enzimas, houve um aumento substancial de suas aplicações, abrindo um leque de possibilidades para a otimização de processos industriais (HAKI e RAKSHIT, 2003). Devido às suas excelentes propriedades funcionais (atividade, seletividade e especificidade), as enzimas são capazes de catalisar em condições amenas, modificações muito rápidas de um único grupo funcional (entre vários grupos semelhantes) existentes em apenas um substrato na presença de outras moléculas muito semelhantes. Portanto, enzimas podem ser excelentes catalisadores industriais em uma variedade de áreas da química industrial, como a química fina, química de alimentos e análises (GUISAN, 2006).

A maioria das características das enzimas como catalisadores são derivadas da sua estrutura molecular. Enzimas são proteínas compostas por um número de resíduos de aminoácidos que vão desde 100 a várias centenas, onde esses aminoácidos são covalentemente ligados através da ligação peptídica. De acordo com a natureza do radical, o aminoácido pode ser polar ou apolar (hidrofóbico) e a distribuição ao longo da molécula da proteína será determinante para o seu comportamento (LEHNINGER *et al.*, 2011). A catálise enzimática ocorre em uma limitada região chamada sítio ativo, que usualmente é formada por

alguns resíduos de aminoácidos, enquanto que o resto da proteína atua na estrutura conformacional (ILLANES e ALTAMIRANO, 2008).

Segundo WILSON e WALKER (2010), para várias enzimas, a velocidade inicial da reação varia hiperbolicamente com a concentração do substrato para uma concentração fixa de enzima. A equação matemática que expressa essa relação hiperbólica entre velocidade inicial e a concentração de substrato (Figura 1) é conhecida como equação de Michaelis-Menten (Equação 1):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

Onde V_{max} é o valor máximo da velocidade inicial quando todos os sítios ativos estão ocupados, K_m é a constante de Michaelis-Menten e $[S]$ é a concentração do substrato.

Quando a concentração do substrato é tal que a velocidade de reação é metade da velocidade máxima, obtém-se:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \Rightarrow \frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \Rightarrow$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \Rightarrow K_m + [S] = 2[S] \Rightarrow K_m = [S] \quad \text{Equação 2}$$

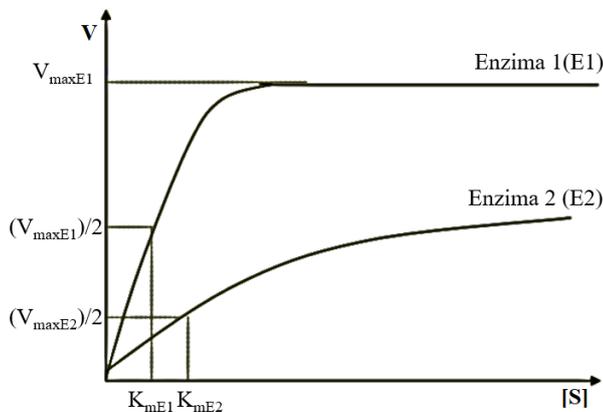


Figura 1. Comportamento cinético de duas enzimas distintas. Fonte: WILSON e WALKER (2010) e DUTTA (2008), com adaptações.

Sob estas condições a velocidade da reação é somente dependente da conversão do complexo enzima-substrato, em produto e da difusão dos produtos a partir da enzima. A partir da Equação 2, pode ser observado que nessa condição K_m é numericamente igual à concentração do substrato quando a velocidade inicial é igual à metade da sua velocidade

máxima, tendo como unidade a molaridade. Valores de K_m estão na faixa de 10^{-2} a 10^{-5} M e são importantes pois permitem calcular a concentração do substrato necessária para saturar todos os sítios ativos da enzima. Deste modo, o valor de K_m é inversamente proporcional a afinidade da enzima pelo substrato e pode ser demonstrado de maneira mais clara na Figura 1, quando comparamos as curvas cinéticas de duas enzimas distintas aplicadas na mesma concentração. Percebe-se que com $K_{mE2} > K_{mE1}$ o V_{max} para a Enzima 2 é menor que a V_{max} da Enzima 1, portanto podemos concluir que a Enzima 1 tem uma maior velocidade reacional e uma maior afinidade pelo substrato.

Segundo LEHNINGER *et al.* (2011), as enzimas são divididas em seis grandes classes (Oxidoredutases, Transferases, Hidrolases, Liases, Isomerases e Ligases), cada uma com sua subclasse conforme o tipo de reação catalisada. A cada enzima é atribuído um número classificatório de quatro dígitos e um nome sistemático, que indica o tipo de reação que ela catalisa. Por intermédio de um acordo internacional estabelecido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), foi adotado um sistema para nomear e classificar as enzimas onde, por exemplo, a enzima lipase recebe o nome de triacilglicerol hidrolases, e tem a seguinte classificação: E.C. 3.1.1.3 (EC: Classificação enzimática; 3: Classe das Hidrolases; 1: atuam em ligações de éster; 1: hidrolases de ésteres carboxílicos; 3: número da ordem da enzima) (WEBB, 1992).

3.1.1. Lipase

As lipases são enzimas geralmente versáteis que aceitam uma ampla gama de substratos (ésteres alifáticos, alicíclicos, bicíclicos e aromáticos, tioésteres, aminas ativadas) mantendo ao mesmo tempo elevada régio-, quimio- e enantiosselectividade. A estabilidade da maioria das lipases em solventes orgânicos abre o caminho para a sua exploração em síntese orgânica nas reações de esterificação, transesterificação, aminólise e oximólise. Tais propriedades fazem lipases atores fundamentais no setor da enzima industrial (ALBERGHINA, 2007). Tais enzimas são produzidos em grande parte em micro-organismos e, especificamente, lipases bacterianas desempenham um papel vital em empreendimentos comerciais.

Lipases podem ser produzidas comercialmente, com a maioria tendo origem de bacteriana ou de fungo. Lipases de origem bacteriana possuem peso molecular na faixa de 19-60 kDa. Todas exibem a característica padrão conhecida como a dobra α/β -hidrolase, onde o

núcleo da lipase é composto por uma folha β central constituída em até 8 diferentes β fios ($\beta 1$ - $\beta 8$) conectadas por até 6 α hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 6$). O sítio catalítico é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos Serina, Ácido Aspártico (ou Glutâmico) e Histidina. O resíduo nucleofílico Serina está localizado no terminal-C no final do fio $\beta 5$ em um pentapeptídeo altamente conservado formando a característica β -vira- α denominado "cotovelo nucleofílico". A hidrólise do substrato inicia-se com um ataque nucleofílico por parte do catalisador-Ser-oxigênio no átomo de carbonila da ligação éster, conduzindo à formação de um intermediário tetraédrico estabilizada pelo hidrogênio ligando-se aos átomos de nitrogênio dos resíduos de aminoácidos pertencentes ao chamado "buraco oxianion". Um álcool é liberado, deixando de lado um complexo lipase-acil, que finalmente é hidrolisado com a liberação de ácido graxo e regeneração da enzima (JAEGER e REETZ, 1998). Estruturalmente, além da região que compõe o sítio ativo, existe uma estrutura anfipática móvel que cobre o sítio ativo catalítico da maioria das lipases, chamada região de tampa hidrofóbica ou lid, que está envolvida na seletividade de lipases através da ativação interfacial (SECUNDO *et al.*, 2006).

A ativação interfacial ocorre da seguinte maneira, as lipases são enzimas complexas que normalmente têm duas conformações, uma fechada em que o centro ativo está isolado do meio por uma cadeia polipeptídica (tampa) e uma forma aberta, onde a tampa é deslocada e o centro ativo da lipase é exposto ao meio. A conformação aberta apresenta uma área hidrofóbica muito grande exposta ao meio, formada pelos resíduos em torno do centro ativo da lipase e pelos grupos na face interna da tampa. A exposição da lipase a um meio hidrofílico (por exemplo, uma solução tampão) é desfavorável, fazendo com que a enzima em meio homogêneo aquoso permaneça na conformação fechada. No entanto, a lipase na conformação aberta torna-se adsorvida e estabilizada nas gotas hidrofóbicas dos óleos por serem os seus substratos naturais, permitindo que estas enzimas atuem sobre a interface (REIS *et al.*, 2006; SCHRAG *et al.*, 1997; VERGER e DE HAAS, 1976).

Dentre as Lipases comerciais, a lipase proveniente da bactéria *Burkholderia cepacia* (LBC) vem demonstrando destaque por ser uma enzima útil que catalisa uma ampla gama de reações diferentes em água e solventes não polares em condições suaves. É um catalisador altamente seletivo para uma ampla gama de substratos, incluindo a resolução cinética de misturas racêmicas de álcoois secundários por hidrólise em água ou esterificação em solventes orgânicos (TRODLER *et al.*, 2009).

O diagrama topológico da Lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) é demonstrado na Figura 2, onde pode-se observar a tríade catalítica representadas por Ser (Serina), His (Histidina) e Asp (Ácido aspártico) / Glu (Ácido glutâmico).

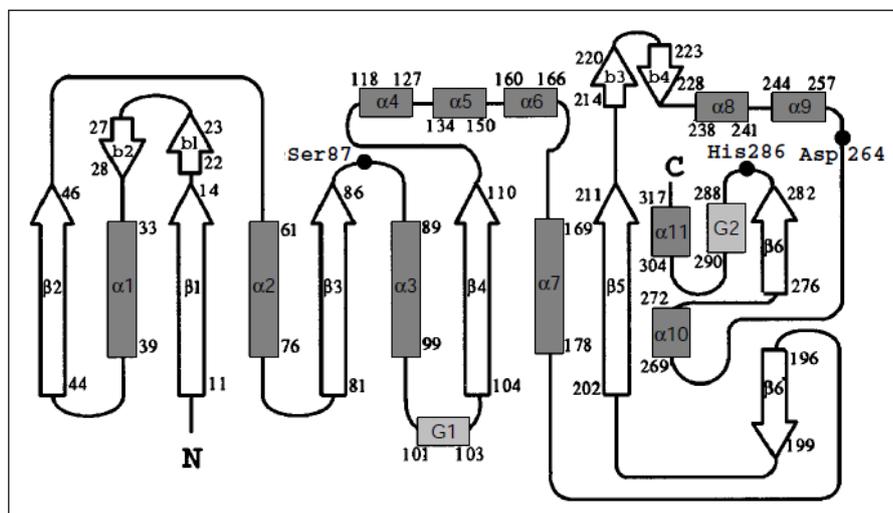


Figura 2. Diagrama topológico estrutural da lipase *Burkholderia cepacia*. Fonte: KIM *et al.* (1997)

Sendo assim, para obter uma melhor visualização da ativação interfacial da LBC, TRODLER *et al.* (2009) realizou múltiplas simulações da dinâmica da molécula para as conformações aberta e fechada da tampa utilizando modelos explícitos de solventes de água e tolueno, pois as moléculas de água são supostamente essenciais para manter a flexibilidade da lipase. Para cada sistema um comportamento similar foi identificado, onde, houve uma abertura rápida da tampa quando o tolueno entrava em contato com a estrutura fechada, e, um rápido fechamento quando em contato com a água. A Figura 3, demonstra a transição conformacional da LBC.

Observa-se então que a LBC demonstra uma alta preferência para catalisar meios hidrofóbicos, como a hidrólise de triglicerídeos com cadeia carbônica maior que oito (BORNSCHEUER *et al.*, 1994). Essa enzima vem sendo utilizada para síntese orgânica e hidrólise devido a sua enantioseletividade (KAZLAUSKAS *et al.*, 1991; WEISSEFLOCH e KAZLAUSKAS, 1995).

Apesar do elevado potencial de aplicação das enzimas, devido à pressão dos consumidores, elas precisam ser otimizadas, de modo a cumprirem suas funções biológicas eficientemente.

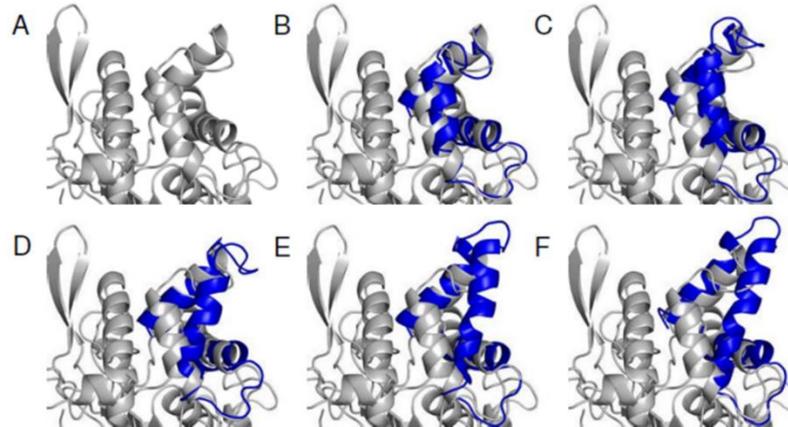


Figura 3. Transição conformacional da LBC, encontrando-se com tampa fechada na etapa A e gradualmente abrindo a tampa do sítio ativo, na cor azul, após 30ns de fornecimento de tolueno. (A) no início; (B) depois de 3ns; (C) 7 ns; (D) 10 ns; (E) 17 ns. Fonte: TRODLER *et al.* (2009), com modificações.

O aumento do uso de enzimas imobilizadas é de particular interesse, uma vez que as enzimas ficam fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço (suporte) com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usada repetidamente e continuamente. Nesta técnica, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo enzima–suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel (BON *et al.*, 2008)

3.2. Imobilização de Enzimas

Por razões econômicas e técnicas, a maioria dos processos químicos catalisados por enzimas requer o seu reuso ou o uso contínuo do biocatalisador por um extenso período de tempo. Dentro desta perspectiva, a imobilização de enzimas pode ser definida como uma técnica que nos permite a reusar ou utilizar continuamente o biocatalisador (GUISAN, 2006). No entanto, a ideia de reutilizar a enzima implica que a estabilidade da preparação da enzima final deve ser suficientemente elevada para permitir que essa reutilização seja realizada. A enzima precisa ser muito estável, ou então se tornar altamente estabilizada durante o processo de imobilização (MATEO *et al.*, 2007).

As propriedades das preparações de enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do material do suporte (TISCHER e KASCHE, 1999). As características do suporte são de importância primordial na determinação do desempenho do biocatalisador imobilizado. Propriedades ideais em um suporte incluem resistência física à compressão, hidrofiliicidade, inércia em relação facilidade de derivatização enzimática, biocompatibilidade, a resistência ao ataque microbiano, e disponibilidade à baixo custo (BELCHETZ *et al.*, 1977; STORM *et al.*, 1997). Segundo BON *et al.* (2008) dentre os vários parâmetros que devem ser considerados os mais importantes são apresentados na Tabela 1, os quais incluem pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de co-fatores e do substrato com a remoção dos produtos. Estes fatores influenciam no desempenho do suporte, na conformação da enzima, na velocidade de transferência de massa e de reação intrínseca, e, portanto, afetam o comportamento da enzima imobilizada. Assim sendo, a interação entre a enzima e o suporte gera um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. Na Figura 4 é demonstrado o estudo que deve ser realizado para a preparação de um biocatalisador imobilizado.

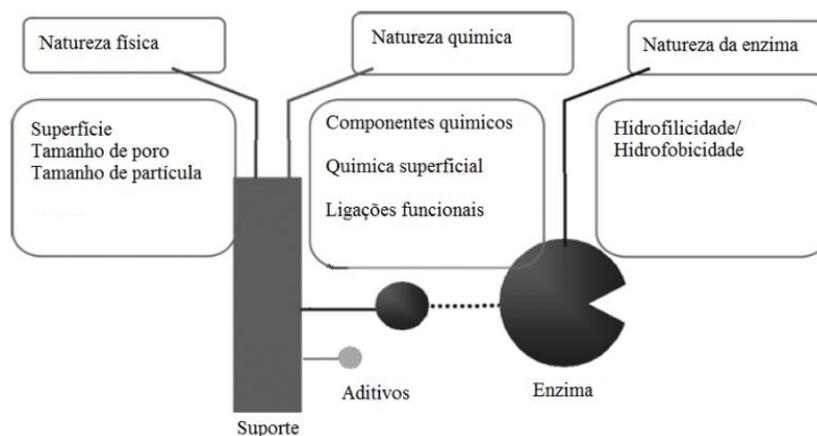


Figura 4. Ilustração generalizada sobre os principais parâmetros utilizados para a imobilização enzimática. Fonte: CAO *et al.*, (2005), com modificações.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção, da ligação utilizando um reagente multifuncional, de ligações cruzadas da enzima em um material insolúvel, assim como em seu confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA e NASCIMENTO, 2004).

Tabela 1. Fatores que influenciam o desempenho de uma enzima imobilizada.

Enzima	<p><u>Propriedades Bioquímicas:</u> Massa molecular, grupos funcionais da superfície proteica, pureza (funções de inativação ou proteção das impurezas).</p> <p><u>Parâmetros Cinéticos:</u> Atividade específica, perfil de pH e temperatura, parâmetros cinéticos para a ativação e inibição, estabilidade térmica, pH, solventes, contaminantes e impurezas.</p>
Suporte	<p><u>Características Químicas:</u> Composição e base química, grupos funcionais, estabilidade química, contribuições da superfície do suporte, tais como: os micro-efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos).</p> <p><u>Características Mecânicas:</u> Diâmetro do poro, comportamento de compressão, tamanho da partícula; área superficial; volume acessível da matriz, resistência à compactação em operações em altas vazões para reatores de leito fixo; abrasão para reatores agitados e velocidade de sedimentação para leitos fluidizados.</p> <p><u>Características Morfológicas:</u> Suportes não-porosos (baixa área superficial), porosos (grande área superficial), estrutura de gel.</p>
Enzima Imobilizada	<p><u>Método de Imobilização:</u> Fixação de proteína, eficiência da enzima ativa, parâmetros cinéticos intrínsecos.</p> <p><u>Efeitos de transferência de massa:</u> Partição (diferente concentração do soluto dentro e fora das partículas do catalisador), difusão interna (poros) e externa.</p> <p><u>Estabilidade:</u> operacional (expressa em tempo de meia-vida sob condições operacionais), estabilidade de estocagem</p> <p><u>Desempenho:</u> Produtividade (produto formado por unidade de atividade ou massa de enzima), consumo de enzima (e.g. unidades por kg de produto)</p>

Fonte: BON *et al.*, (2008), com modificações

Estas são combinações de métodos químicos que envolvem a formação de, no mínimo, uma ligação covalente entre os resíduos terminais de uma enzima e um grupo funcional do suporte, ou entre duas ou mais moléculas de enzima; métodos físicos que envolvem as forças

físicas como adsorção, interações eletrostáticas; métodos de encapsulação ou microencapsulação em matrizes poliméricas (CARVALHO *et al.*, 2014). Na Figura 5, demonstra-se o mecanismo dos principais tipos de imobilização discutidos na literatura (IQBAL *et al.*, 2013).

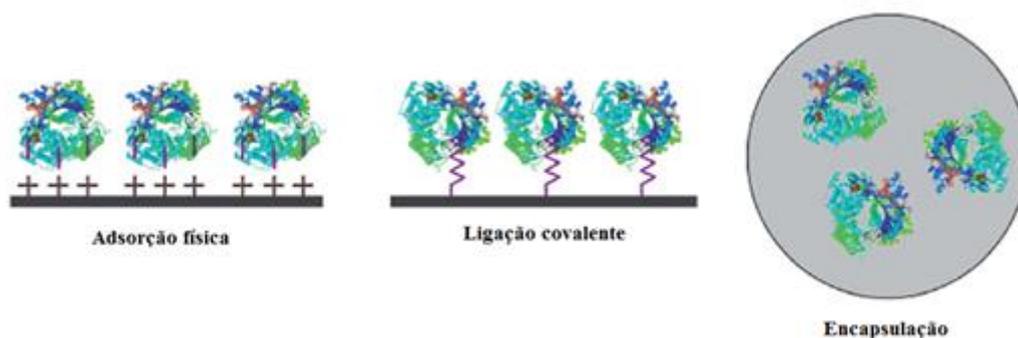


Figura 5. Principais métodos de imobilização de enzimas. Fonte: IQBAL *et al.* (2013), com modificações.

3.2.1. Adsorção Física

É a técnica mais antiga de produção de enzimas imobilizadas, assim como a mais simples, geralmente preserva a atividade catalítica da enzima, sendo considerado um método economicamente atraente. Consiste em colocar em contato a solução enzimática aquosa com o suporte (superfície adsorvente), em determinadas condições de pH, temperatura e agitação. Após a imobilização o suporte é lavado para remoção das moléculas de enzima que não foram adsorvidas (MESSING, 1976). As enzimas estão ligadas ao suporte através de ligações de hidrogénio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Nesse processo, as naturezas das forças envolvidas podem ser revertidas, mudando as condições que influenciam a força da interação (por exemplo, pH, força iónica, temperatura ou a polaridade do solvente). As desvantagens da técnica de adsorção física incluem que a enzima pode ser facilmente lixiviada a partir da superfície do suporte em um meio aquoso quando as interações são relativamente fracas (GUISAN, 2006). O processo de adsorção não é específico e algumas vezes pode provocar a inativação parcial ou total da enzima. Neste caso, somente suportes com alta afinidade pela enzima podem causar a sua menor desnaturação (BON *et al.*, 2008).

Estudos da isoterma de adsorção desempenha um papel importante no procedimento de modelagem preditiva na análise e planeamento de um processo de adsorção, tal

modelagem vem sendo utilizada para prever o comportamento da enzima na superfície do suporte quando empregada a imobilização por adsorção física (AL-DURI e YONG, 2000; ALVES *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2017; LAGE *et al.*, 2016; TU *et al.*, 2009; MIRANDA *et al.*, 2014; RAMANI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014; TRAN *et al.*, 2012).

Os principais modelos utilizados para prever o comportamento da enzima na superfície do suporte estão listados na Tabela 2 seguidas de sua descrição e equação segundo ilustrado por FOO e HAMEED (2010).

Tabela 2. Descrição dos principais modelos de isotermas aplicados no estudo do comportamento da enzima na superfície do suporte.

Isoterma	Aplicação	Equação	
Langmuir	Descreve adsorção homogênea, onde cada molécula possui uma entalpia constante e uma energia de ativação de adsorção (todos os sítios possuem afinidade igual para o adsorvato)	$Q_e = \frac{Q_{max} * C_e}{K_L + C_e}$	Equação 3
Freundlich	Aplicado à adsorção de camadas múltiplas, com distribuição não uniforme de adsorções sobre uma superfície heterogênea	$Q_e = K_F * C_e^{(1/n)}$	Equação 4
Redlich–Peterson	Forma combinada das isotermas de Langmuir e Freundlich. Se aproxima do modelo de Freundlich na região de alta concentração de adsorbante (exponente tendendo a zero) enquanto que em baixa concentração se aproxima do modelo de Langmuir	$Q_e = \frac{K_{RP} * C_e}{1 + a * C_e^b}$	Equação 5
Sips	Outra forma combinada das isotermas de Langmuir e Freundlich deduzidas para prever os sistemas de adsorção heterogêneos e contornar a limitação da concentração de adsorbente crescente associada ao modelo de isoterma de Freundlich. Em baixas concentrações de adsorvato, reduz-se a isoterma de Freundlich; Enquanto a altas concentrações, prevê uma capacidade de adsorção monocamada característica da isoterma de Langmuir.	$Q_e = \frac{K_s * C_e^{Bs}}{1 + (a_s * C_e^{Bs})}$	Equação 6

Onde Q_e é a capacidade de adsorção no equilíbrio (U/g), C_e é a concentração de enzima residual no sobrenadante após a adsorção (U/mL), Q_{max} é a capacidade máxima de adsorção do suporte (U/g), K_L é a constante de Langmuir (mL/U), K_F é a constante de Freundlich (U/g), n é o expoente de Freundlich (adimensional), K_{RP} (mL/U) e α (1/U) são as constantes de Redlich–Peterson, b é o seu expoente (adimensional), K_S e a_S (mL/U) são as constantes de Sips e B_S é o seu expoente (adimensional).

No entanto, utilizando a equação de Langmuir (Equação. 3), uma constante adimensional comumente conhecida como fator de separação (R_L) definida por WEBER e CHAKRAVORTI (1974) representada de acordo com a Equação. 7

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L * C_0} \quad \text{Equação 7}$$

Onde C_0 indica a concentração inicial de adsorvato (mg/mL). Nesse contexto, baixos valores de R_L reflete em um processo de adsorção mais favorável. Em uma explicação mais profunda, o valor de R_L indica a natureza do processo de adsorção podendo ser não favorável ($R_L > 1$), linear ($R_L = 1$), favorável ($0 < R_L < 1$) ou irreversível ($R_L = 0$).

De acordo com ZUYI e TAIWEI (2000), existe um equilíbrio entre as moléculas adsorvidas (AS) na superfície do sólido (S) e nas moléculas que estão na fase líquida (A) de acordo como demonstrado na Equação. 8.



Onde K_a e K_d são respectivamente as taxas constantes de adsorção e dessorção. No equilíbrio, ambas as taxas são iguais, então $K_c = K_a/K_d$.

Analogamente, considerações termodinâmicas também são realizadas para concluir se o processo aconteceu de maneira espontânea ou não no processo de adsorção. A imobilização por adsorção física ocorre de maneira espontânea quando em uma dada temperatura a energia livre de Gibbs, ΔG (kJ/mol), relacionada descrita de acordo a Equação. 9 ocorre em um número negativo.

$$\Delta G = -RT_{ab} \ln(K_c) \therefore K_c = \frac{Q_e}{C_e} \quad \text{Equação 9}$$

Onde R é a constante universal dos gases (8.314 J/mol K), T_{ab} é a temperatura absoluta (298,15K) e K_c é a constante de equilíbrio do fenômeno de adsorção. ALVES *et al.* 2016 relata que o aumento do carregamento de proteína no processo de imobilização por adsorção

física reduz a espontaneidade do processo devido à redução na área superficial disponível no suporte em questão para adsorver a enzima (saturação do suporte).

Processos de adsorção com ΔG até -20 kJ/mol corresponde a interações adsorvente/adsorbato ocorrendo por intermédio do fenómeno de adsorção física, por outro lado, quanto mais negativo os valores de ΔG chegam abaixo de -40 kJ/mol, pode-se corresponder ao processo interações por intermédio de ligações químicas (TU *et al.*, 2009).

3.2.2. Ligação Covalente

Este método de imobilização baseia-se na formação de uma ligação covalente entre a enzima e o suporte, é frequentemente mais complexo e utilizam condições menos brandas do que as demais técnicas de imobilização. Como a ligação formada é forte, a enzima imobilizada obtida por este método é estável, isto é, não se solta do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica. A ativação do grupo ligante é frequentemente realizada no suporte a fim de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima, geralmente, a ligação covalente ocorre com o grupo amino da lisina presente nas enzimas e grupo aldeído do suporte. As reações de ativação do suporte podem ser por: diazotização, formação de ligação amida, alquilação e arilação, formação de base de Schiff, reação de Ugi, reações de amidinação, troca do dissulfeto-tiol, interações enzima-mercúrio e ligação induzida por radiação (MILETIĆ *et al.*, 2012).

Com o objetivo de melhoria para conseguir alta atividade enzimática, algumas vezes, são utilizadas técnicas que procuram evitar a inativação dos resíduos de aminoácidos do centro ativo da enzima. Dentre estas se pode citar: a ligação covalente da enzima na presença de um inibidor competitivo ou do substrato, a ligação reversível de um complexo enzima-inibidor, a modificação química de uma enzima solúvel, induzindo a ligação com o suporte pelos novos grupos introduzidos, e a ligação multipontual da enzima ao suporte (BON *et al.*, 2008).

Um esquema representativo do processo de formação da ligação multipontual é representado na Figura 6, tal método pode produzir uma estrutura mais rígida e menos sensível a alterações conformacionais, assim, a atividade da enzima sob condições drásticas pode tornar-se maior do que a da enzima livre. A superfície do suporte pode produzir alguns efeitos que podem afetar o desempenho da enzima, através de separação de substratos, produtos ou componentes do meio de reação (RODRIGUES *et al.*, 2013).

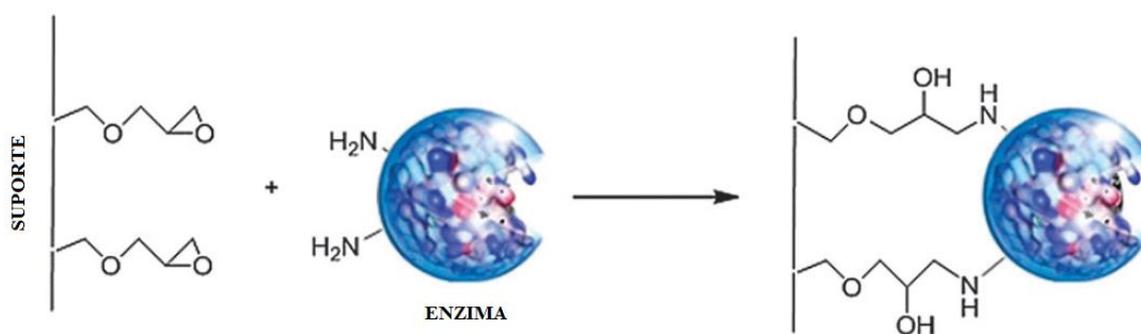


Figura 6. Esquema da funcionalização e a ativação de suportes inorgânicos durante a imobilização covalente multipontual (funcionalização com grupos $-NH_2$ e a ativação com brometo de cianogênio é relatado como um exemplo). Fonte: SHELDON e VAN PELT (2013)

Outro tipo de imobilização por ligação covalente é a imobilização por ligações cruzadas, nesse método as enzimas são fortemente ligadas entre si, com a utilização de um agente multifuncional. É primordial nesta técnica de imobilização a seleção de um reagente que promova a ligação entre grupos não envolvidos na catálise e que esteja em concentração suficiente para a completa imobilização e manutenção da atividade enzimática (CARVALHO *et al.*, 2014).

Ainda pode-se salientar a possibilidade de co-imobilizar dois ou mais tipos de enzimas formando o agregado enzimático por ligações cruzadas, definido na literatura por CLEA (cross-linked enzyme aggregates), sendo assim, capazes de catalisar múltiplas biotransformações, em passo único ou em sequência de uma série de processos catalíticos. É considerado como um método de relativo baixo custo referente a outros métodos de imobilização, uma vez que não necessita de suporte de custo elevado e o produto final é puro devido ao uso de sulfato de amônio como substrato (GARCIA-GALAN *et al.* 2011).

O procedimento consiste na precipitação da enzima para a obtenção de agregados, onde é posteriormente reticulado com glutaraldeído. Na preparação do CLEA, o grupo aldeído do glutaraldeído reage com os grupos amino da proteína. Por vezes, o teor de amina da enzima é baixo e a reticulação pode não ser muito eficaz. Para superar este problema, a agregação pode ser preparada na presença de certos aditivos tais como albumina de soro bovino que tem um grande número de grupos amina (KHANAHMADI *et al.*, 2016).

3.2.3. Encapsulamento

O encapsulamento de enzimas consiste no aprisionamento da biomolécula numa matriz, não existindo uma associação covalente entre a matriz e a enzima. Essa técnica restringe a rotação da enzima, ainda assim permitindo o reconhecimento do substrato em meio reacional (DAVE *et al.*, 1995; EDMISTON *et al.*, 1994; GOTTFRIED *et al.*, 1999).

Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem (DALLA-VECCHIA e NASCIMENTO, 2004).

As vantagens de imobilizar a enzima por essa técnica podem ser identificadas como principalmente a permeabilidade das matrizes, permitindo o transporte de compostos com baixo peso molecular entre os poros do biocatalisador imobilizado, a porosidade do material, permitindo o alojamento de biomoléculas de diferentes tamanhos, a resistência a químicos, térmicos, e a degradação biológica; e efeitos de inchaço desprezíveis (GUISAN, 2006)

No entanto, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

A encapsulação da enzima pode ser realizada através da técnica Sol-Gel, sendo assim, a encapsulação é resultante de dois processos simultâneos: condensação dos precursores de sílica para formação da rede porosa de sílica e a encapsulação da enzima. As variáveis do processo envolvem a análise do tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, determinando assim, as características finais do sistema, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto. Além disso, aditivos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico (CARVALHO *et al.*, 2014).

3.3. Sílica Aerogel

A nanotecnologia é a ciência que estuda os nanomateriais que consistem em policristais com grãos menores que 100 nanômetros, em pelo menos uma direção (BŁASZCZYŃSKI *et al.*, 2013). A produção de nanomateriais é um bom exemplo do desenvolvimento acelerado da nanotecnologia, de modo que um dos seus desafios atuais é o aumento de protocolos experimentais para a sua síntese sobre uma variedade de composições químicas, tamanhos de partícula e elevada monodispersão (DOLATABADI e DE LA GUARDIA, 2011).

As nanopartículas de sílica provaram ser importantes em várias aplicações biotecnológicas e biomédicas tais como a produção de biossensores, de drogas, biocatalisadores, marcação celular, separação de células, agentes de contraste para ressonância magnética e ultrassom (NEETHIRAJAN *et al.*, 2009). A sílica é um óxido inorgânico amorfo formado por processos de polimerização, sendo assim, para a obtenção da sílica a técnica sol-gel tem atraindo grande interesse (VIOUX *et al.*, 2010). Devido a vasta diversidade de aplicações, a preparação da sílica requer a preparação de materiais de diferentes estruturas porosas e variadas características físico-químicas (SKUBISZEWSKA-ZIĘBA *et al.*, 2016). A formação da sílica, ocorre através de reações de hidrólise e policondensação de precursores, tais como tetraetilortossilicato (TEOS) (BARBOSA *et al.*, 2016), como demonstrado na Figura 7.

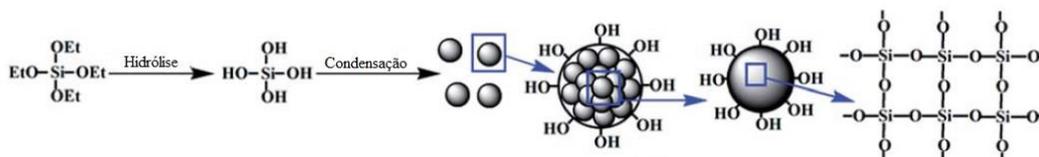


Figura 7. Representação esquemática do processo de crescimento de nanopartículas de sílica pura a partir de TEOS. Fonte: ZHANG *et al.* (2014), com modificações.

Observa-se que a formação do gel da sílica se precede pela hidrólise do $\text{Si}(\text{OR})_4$ seguido de condensação para se obtenção de uma rede polimérica em SiO_2 ponte-oxo. A hidrólise converte a ligação $\text{Si}-\text{OR}$ para $\text{Si}-\text{OH}$ que se condensam para formar a estrutura de ligações $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ oxo ponte, essas reações ocorrem numa região localizada conduzindo à formação de partículas de sol. Enquanto a policondensação procede, o grau de ligação cruzada entre as partículas aumenta e a viscosidade do sol é aumentada, assim, este material viscoso solidifica e conduz à formação de um gel poroso (DUNN *et al.*, 1998). No processamento clássico de sol-

gel, a fase líquida é removida, onde o material alvo será um sólido poroso obtido após a sua secagem (VIOUX *et al.*, 2010).

Dependendo do método utilizado para extrair o fluido do poro da matriz sol-gel de sílica, um sólido com porosidade variável pode ser obtido (BŁASZCZYŃSKI *et al.*, 2013). Na Figura 8 é possível diferenciar três técnicas de secagem, onde o mais convencional é a secagem ao ar ambiente, que não são capazes de preservar a estrutura do gel conduzindo a formação de xerogéis (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

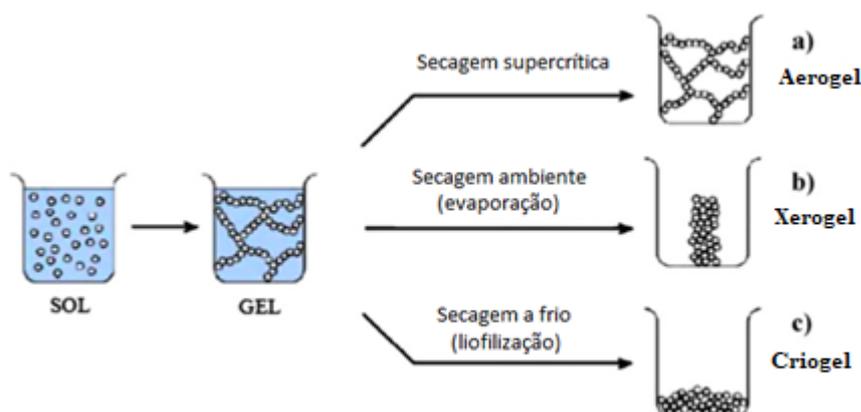


Figura 8. Tipos de secagem da Sílica. Fonte: GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.* (2012), com modificações.

A técnica de liofilização consiste em baixar a temperatura do gel abaixo da temperatura de cristalização do solvente, o solvente é então removido como um vapor por redução da pressão (sublimação), produzindo o criogel (COMIN *et al.*, 2012), já o aerogel é seco pelo método supercrítico, que tem o efeito de atenuar em grande parte (em teoria suprimir) as tensões capilares que comprimem a rede do gel, isso geralmente tem um efeito menor na área de superfície específica do gel, que não é muito diferente em xerogéis. Por outro lado, isto tem um efeito drástico sobre o volume específico de poros, sendo muito maior em aerogéis do que em xerogéis (EL RASSY *et al.*, 2004a). No entanto, há autores que fazem uso de líquidos iônicos, dotados com pressão de vapor desprezível, permitindo considera-lo como parte do gel. Este sistema sólido-líquido estável é chamado ionogel, combinando as propriedades físicas das duas redes (óxido e líquido iônico) intercalados em escala nanométrica (VIOUX *et al.*, 2010).

Os aerogéis de sílica são únicos entre os materiais sólidos devido à sua densidade extremamente baixa (por volta de $0,003 \text{ g/cm}^3$), alta porosidade (até 99% em volume de um monólito), uma rede de poros aberta e uma elevada área de superfície específica (até $1000 \text{ m}^2/\text{g}$), possuindo uma alta transparência ótica (95% de transmissão na região visível) próximo à transmitância ótica de vidros, baixa condutividade térmica ($<0.02 \text{ W/mK}$) sendo semelhante à das espumas de poliestireno ou de poliuretano, ou características de adsorção muito elevadas semelhantes às encontradas no carvão vegetal (HRUBESH, 1998).

De acordo com a literatura, a utilização de aditivos no processo de imobilização pode influenciar positivamente a atividade e a estabilidade de enzimas imobilizadas (REETZ *et al.*, 2003; ZARCULA *et al.*, 2010). Os LIs por sua vez, vem despertando interesse sobre a sua capacidade de melhorar a solubilidade de proteínas e enzimas, ajustando a velocidade de reação e a extração de compostos diferentes a partir de meios de fermentação (DE LOS RÍOS *et al.*, 2007). Além disso, vem sido relatados como responsáveis na modificação estrutural em suportes para a imobilização de enzimas, resultando em um aumento do rendimento de imobilização e estabilidade operacional para os biocatalisadores imobilizados (LEE *et al.*, 2007; VILA-REAL *et al.*, 2011; ZARCULA *et al.*, 2010).

Foram identificadas potenciais aplicações para a utilização de líquido iônico prótico com proteínas, melhorando a solubilidade e a monodispersidade de proteínas, como agente precipitante e como aditivo. O potencial dos líquidos iônicos leva a implementá-los como aditivos no processo de imobilização sol-gel, com a finalidade de proteger contra a inativação de enzimas devido ao álcool de liberação e encolhimento do gel durante o processo de encapsulação (SOUZA *et al.*, 2013).

Dentre as diversas aplicações científicas e técnicas para o aerogel da sílica, tais como adsorventes (por exemplo, de umidade), isolante térmico, na catálise, biosensores para ser aplicado em ciências da vida (por exemplo, detecção de partículas virais) e na biocatálise (suporte na imobilização de enzimas) (KAROUT e PIERRE, 2007).

No que diz respeito a imobilização de enzimas, nos últimos anos, o uso da sílica aerogel é utilizada como suporte objetivando uma melhor estabilização da biomolécula aplicado na catálise de diversos tipos de reação, nas quais é possível identificar na Tabela 3.

As modificações físicas, químicas e morfológicas dos suportes, pela aplicação de aditivos, podem produzir biocatalisadores imobilizados com maior eficiência catalítica devido à minimização dos efeitos difusionais de substratos e produtos durante a reação, além da melhoria da estabilidade operacional em processos contínuos e descontínuos, e por esta razão

desperta também o interesse industrial para estes biocatalisadores (SHELDON e VAN PELT, 2013). A partir das aplicações listadas na Tabela 3, é possível identificar que o aerogel foi modificado quimicamente objetivando a melhoria de suas características físico-químicas e melhorando conseqüentemente o seu desempenho como suporte na imobilização de enzimas.

Os autores e BUISSON e PIERRE (2006) e NASSREDDINE *et al.* (2008) utilizaram a sílica aerogel mecanicamente reforçada pela impregnação de feltro de fibra cerâmica de quartzo no sol da sílica contendo a enzima antes da gelificação, o biocatalisador encapsulado resultante foi aplicado na reação de esterificação de ácido láurico por 1-octanol em isoctano e na reação de transesterificação do óleo de girassol. No primeiro caso, o biocatalisador pode ser reutilizado até 42 vezes sem qualquer deterioração significativa, no segundo caso, o biocatalisador atingiu por volta de 90% de conversão de biodiesel e pode ser reutilizado até 5 vezes.

GAO *et al.* (2009, 2010a, 2010b) utilizaram a sílica aerogel modificada com grupo metila na imobilização de enzimas resultando em um suporte hidrofóbico permitindo a enzima ser sucecivelmente imobilizada por adsorção física obtendo uma reteção de atividade enzimática de 56,44%. Barbosa et al 2016 relata a modificação do aerogel utilizado o líquido iônico prótico C₅ (Pentanoato N-metilmonoetanolamônio) onde resultou em um aumento significativo da sua área superficial (de 81 para 322 m²/g), volume de poro (0,04 para 0,8 cm³/g) e diâmetro de poro (1,1 para 5,0nm), tornando-o um melhor suporte para imobilização de enzimas quando comparado com o aerogel convencional aplicado como controle experimental.

Tabela 3. Prospecção acadêmica referente a pesquisa utilizando aerogel aplicado na tecnologia de imobilização de enzimas em ordem cronológica.

Técnica de imobilização	Enzima imobilizada	Reação aplicada	Autor
Adsorção física e encapsulação	Penicilina G amidase (PGA), Termolisina e Alfa-quimotripsina	Acilação de L-TyrOEt com fenilacetato de metila em tolueno	BASSO <i>et al.</i> , (2000)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Esterificação do 1-octanol por ácido láurico	BUISSON, (2001)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Esterificação de 1-octanol com ácido láurico que produz laurato de octilo	PIERRE e BUISSON (2001)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Esterificação de ácido láurico com 1-octanol e reação de hidrólise de laurato de octilo.	MAURY <i>et al.</i> , (2002)
Encapsulação	Lipase <i>Candida rugosa</i> e Lipase pancreática do porco	Esterificação de ácido butírico em sistema sem solvente à pressão atmosférica	NOVAK <i>et al.</i> , (2003)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Transesterificação de 1-octanol com laurato de vinila produzindo laurato de octilo e acetaldeído	EL RASSY <i>et al.</i> , (2004a)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Esterificação do ácido laurico com 1-octanol	EL RASSY <i>et al.</i> , (2004b)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Esterificação do ácido laurico com 1-octanol	MAURY <i>et al.</i> , (2004)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Esterificação de ácido láurico com 1-octanol	MAURY <i>et al.</i> , (2005)

Continuação da **Tabela 3**. Prospecção acadêmica referente a pesquisa utilizando aerogel aplicado na tecnologia de imobilização de enzimas em ordem cronológica.

Técnica de imobilização	Enzima imobilizada	Reação aplicada	Autor
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i> e Lipase <i>Candida antártica</i>	Síntese de biodiesel por transesterificação de óleo de semente de girassol com acetato de metila	ORÇAIRE <i>et al.</i> , (2006)
Encapsulação	Lipase <i>Candida rugosa</i>	Reação de esterificação do ácido láurico por 1-octanol, em isooctano	BUISSON e PIERRE (2006)
Encapsulação	Cellulase <i>Humicola insolens</i>	Hidrólise de carboximetilcelulose em meio aquoso	PALJEVAC <i>et al.</i> , (2007)
Encapsulação	Lipase <i>Candida antarctica</i> imobilizada (Lipozyme)	Síntese de biodiesel por com óleo de sementes de girassol com metanol, sem solvente	NASSREDDINE <i>et al.</i> , (2008)
Encapsulação	Proteína fluorescente vermelha recombinante	O teste de degradação por uma protease	LI <i>et al.</i> , (2008)
Adsorção física	Lipase <i>Candida rugosa</i> tipo VII	Hidrólise do azeite de oliva	GAO <i>et al.</i> , (2009)
Adsorção física	Lipase <i>Candida rugosa</i>	Hidrólise do azeite de oliva	GAO <i>et al.</i> , (2010a)
Adsorção física	Lipase <i>Candida rugosa</i> , Lipase <i>Candida Antarctica B</i> livre (LCALB) e Lipase pancreática do porco	Hidrólise do azeite de oliva	GAO <i>et al.</i> , (2010b)

Continuação da **Tabela 3**. Prospecção acadêmica referente a pesquisa utilizando aerogel aplicado na tecnologia de imobilização de enzimas em ordem cronológica.

Técnica de imobilização	Enzima imobilizada	Reação aplicada	Autor
Adsorção física	Lipase <i>Rhizopus oryzae</i>	Síntese de oleato de n-butila por esterificação do ácido oleico com n-butanol utilizando hexano como solvente orgânico	KHARRAT <i>et al.</i> , (2011)
Encapsulação	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Hidrólise do azeite de oliva	BARBOSA <i>et al.</i> , (2014)
Encapsulação/ Adsorção física /Ligação Covalente	Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>	Hidrólise do azeite de oliva	BARBOSA <i>et al.</i> , (2016)
Reticulação	Peroxidase do rabanete e catalase	Guar galactomannan foi reticulado utilizando oxidação enzimática para formar hidrogéis	GHAFFAR <i>et al.</i> , (2016)

3.4. Reações catalíticas de síntese de interesse industrial

De acordo com GANDHI (1997), algumas lipases são melhores para reações de síntese do que para reações de hidrólise. As principais reações catalisadas por lipases podem ser classificadas como: Hidrólise, Esterificação e transesterificação (Interesterificação, Alcoólise, Acidólise). Na tabela 4 é listada algumas aplicações industriais da lipase.

Tabela 4. Possibilidades de aplicações industriais das lipases seguido de mecanismo reacional e produto ou processo alvo

Indústria	Reação	Produto ou aplicação
Biocombustíveis	Transesterificação de óleos vegetais/animais	Biodiesel, ésteres etílicos
Detergentes	Hidrólise	Remoção de manchas de óleo de tecidos e etc.
Produtos farmacêuticos	Transesterificação/hidrólise	Enantiômeros, medicamentos, auxiliares digestivos e etc.
Cosméticos	Esterificação/transesterificação	Emulsificantes, hidratantes, emolientes e etc.
Papel	Hidrólise	Papel com qualidade melhorada
Alimentos e bebidas	Hidrólise de gordura do leite, amadurecimento do queijo, modificação da gordura da manteiga	Desenvolvimento de agentes aromatizantes em leite, queijo e manteiga e etc.
	Esterificação ou Transesterificação de ésteres propriedades de melhoramento de sabor e aroma	Prolongamento da vida útil, Maionese e molhos, Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono- e diglicéridos e etc.
	Hidrólise de óleos vegetais/animais	Alimentos saudáveis, suplementos alimentares, Carnes e produtos de peixe.

Fonte: SARNEY (1994), com modificações

Como pode-se observar na Tabela 4, as lipases são utilizadas com sucesso na síntese de ésteres, onde os ésteres produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia curta têm aplicações como agentes aromatizantes na indústria alimentar, enquanto que os ésteres metílicos e etílicos dos ácidos graxos de cadeia longa têm sido utilizados com vistas para produção de biodiesel e emulsificantes nas mais diversas áreas da indústria (SARNEY, 1994).

3.4.1. Produção de ésteres etílicos

O biodiesel definido como uma mistura ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia longa com conversão acima de 98%. É um líquido claro com uma cor de leve a amarelo-escuro, o termo “bio” indica a sua fonte biológica, em contraste com o diesel convencional (VAN KASTEREN *et al.*, 2007). Tem ponto de fusão acima de 200°C, ponto de fulgor entre 145–175 °C, faixa de destilação de 195–325 °C, e pressão de vapor menor que 5 mmHg em 22°C. Também é insolúvel em água, tem um ligeiro odor de mofo/ensaboadado, é biodegradável e tem reatividade estável. No entanto, agentes fortes oxidantes devem ser evitados (DEMIRBAS, 2009). O biodiesel pode ser usado como total ou parcial substituto para o diesel derivado de petróleo, podendo ser usado em sua forma pura, referida como B100, ou misturada com o diesel em diferentes proporções (BX, com X sendo o volume percentual de biodiesel na mistura) sem necessidade de qualquer alteração essencial nos motores de ignição por compressão (AGARWAL, 2007).

Existem várias fontes de triglicerídeos para o biodiesel, tais como óleos vegetais (óleo de coco, soja, canola e etc), gordura animal (banha de porco, sebo de carne) e de óleo residual de cozinha (BHUIYA *et al.*, 2015). No Brasil, 70% da produção do biodiesel é a partir do óleo de soja. Outras fontes, tais como óleo de semente de algodão, óleo residual de cozinha, óleo de palma e a gordura do porco e do frango não têm sido amplamente utilizados hoje em dia, representando menos de 10% (FERNANDEZ *et al.*, 2017). Além de resíduos de óleos de cozinha ou gorduras animais, o mercado de biodiesel também pode utilizar óleos não refinados para diminuição de custos atrelados ao processo (CESARINI *et al.*, 2013)

Dentre todas as rotas, o biodiesel produzido através da catálise química são os mais comercializados, no entanto, as desvantagens dessas rotas quando comparadas ao processo catalisado por enzimas, são os impactos ambientais tais como a disposição de resíduos e da água requerida para a lavagem, a formação de sabão e a purificação (FERNANDEZ *et al.*, 2017). Outras vantagens da biocatálise para a reação de transesterificação são a alta possibilidade de reuso do biocatalisador, regeneração e baixa temperatura reacional (RUHUL *et al.*, 2015). O mecanismo reacional de transesterificação é demonstrado na Figura 9.

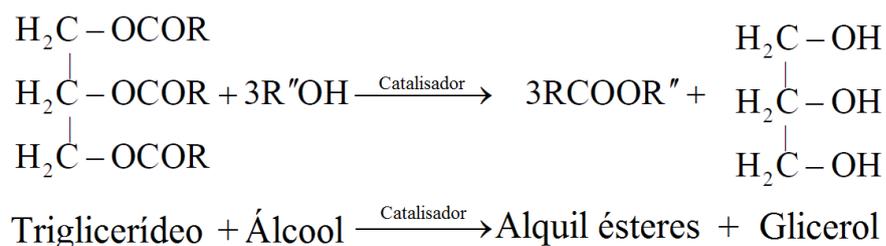


Figura 9. Reação de transesterificação com estruturas moleculares generalizada dos compostos. Fonte: SIMONETTI et al., (2014) e RUHUL et al., (2015) (com modificações).

A qualidade do B100 depende do processo de produção e da estrutura dos lípídeos utilizado como matéria prima. Uma conversão de biodiesel abaixo de 98% indica condições reacionais inapropriadas com presença de impurezas no produto final, como monoglicerídeos (MG), diglicerídeos (DG), triglicerídeos não convertidos, ácidos graxos livres e glicerol. As impurezas podem levar a problemas graves no motor, tais como a corrosão, a formação de depósitos nos bicos de injeção, etc (WAWRZYNIAK *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2008). A nomenclatura utilizada para biodiesel com baixa conversão é de mistura de ésteres etílicos (OLIVEIRA *et al.*, 2014)

A sua presença no biodiesel é limitada por uma legislação rigorosa, como a norma Europeia EN 14015 onde é estabelecido que a quantidade de MG, DG e de glicerol livre, respectivamente, deve ser menor que 0,8;0,2 e 0,02% em peso (regulamentações similares são observadas em outros países) (GRANADOS *et al.*, 2010).

Análise de impurezas de biodiesel são principalmente realizadas por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Vantagens e limitações destas técnicas foram descritos em outros lugares (MONTEIRO *et al.*, 2008). Uma vez analisada a amostra de biodiesel e verificada que de fato existem impurezas invalidando o processo de produção do biocombustível, as impurezas por sua vez podem ser reaproveitadas.

3.4.2. Produção de ésteres de cera

Os ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa e álcoois de cadeia longa, tipicamente referidos como "ésteres de cera" são uma classe importante de orgânicos finos que são amplamente utilizados como matéria-prima na indústria de cosméticos, produtos farmacêuticos, lubrificantes, tintas, revestimentos de madeira e produtos de perfumaria (MUTLU e YILMAZ, 2016). Muitas características atraentes, tais como biodegradabilidade,

não toxicidade e preparação de óleos vegetais fazem ésteres de cera industriais produtos químicos importantes (SUNITHA *et al.*, 2007).

Os ésteres de cera podem ser divididos em ésteres de cera saturados e ésteres de cera insaturados de acordo com as suas estruturas químicas. O óleo de espermacete da baleia cacholote e o óleo de jojoba são as principais fontes de ésteres de cera insaturados.

O espermacete é obtido a partir da cavidade na cabeça da baleia cachalote *P. Macrocephalus*, como demonstrado na Figura 10.

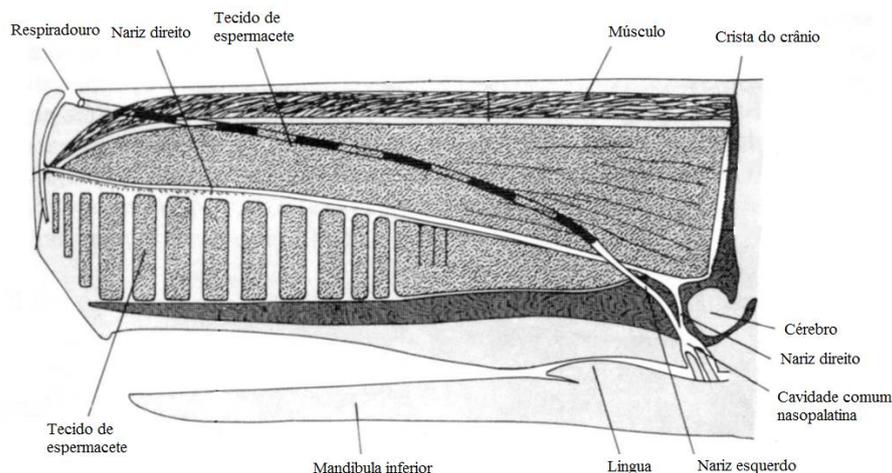


Figura 10. Demonstração da fisiologia da baleia cachalote. Fonte: CLARKE (1978), com modificações.

O órgão encontra-se na região frontal, é utilizado pelo animal como sonar e também serve como órgão de mergulho ou de flutuação. No início de um mergulho, é aspirada água fria que passa pelo órgão do espermacete provocando a solidificação da cera. O aumento do peso específico gera uma força descendente (equivalente a 40 kg) permitindo que os cachalotes possam submergir sem esforço (MORRI, 1973).

A extração do espermacete ocorre por arrefecimento do óleo dos tecidos adiposos da baleia cachalote. O tecido adiposo contém cerca de 10-12% de cera de espermacete que por sua vez possui em sua composição ésteres graxos (65-95%), triglicerídios (5-30%), álcoois livres (1-5%) e ácidos (0-3%). Os ésteres graxos são formados essencialmente de palmitato de cetila (C_{32}) e miristato de cetila (C_{30}), onde foi muito utilizado na medicina da Inglaterra (século 15) e mais tarde em cosméticos, farmácia e também em velas (HOLLOWAY, 1968). Contudo, após a recente regulamentação internacional relativa às capturas de baleias, deixou de ser produzida e vendida. Agora é substituído por espermaceti sintético feito de palmitato de

cetila puro ou misturas à base de óleo de jojoba (CRISP *et al.*, 1984). O esquema de síntese do palmitato de cetila é descrito na Figura 11.

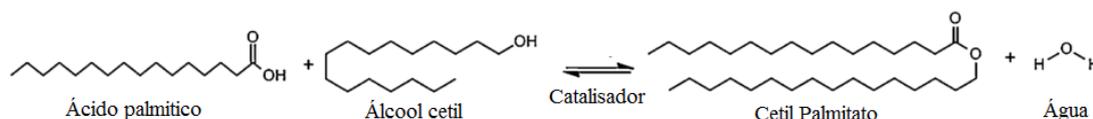


Figura 11. Reação de esterificação do palmitato de cetila. Fonte: MUTLU e YILMAZ (2016), com modificações

A síntese de ésteres de cera é extensivamente investigada há muitos anos, com o objetivo principal de usá-los como um substituto para o óleo de espermacete, nos quais, os processos catalisados por enzimas têm atraído atenção por causa de sua condição de reação amena, ambientalmente sustentável, e a síntese poderia produzir muitos tipos de produtos por meio da especificidade das lipase usadas (MUKHERJEE *et al.*, 2009)

A esterificação catalisada por lipase de ésteres de ácidos graxos com álcoois de cadeia longa foi realizada com sucesso para preparar ésteres de cera. No entanto, a produção de ésteres de cera utilizando lipase tem um gargalo para uma aplicação industrial devido ao elevado custo de obtenção da enzima. A tecnologia de imobilização enzimática pode ser um meio eficaz para permitir a reutilização das enzimas que irá reduzir o custo total da reação bem como a capacidade de melhorar a sua atividade e estabilidade. Assim, a reutilização de enzimas imobilizadas é muito importante, pois minimiza os custos e permite a viabilidade econômica (UNGCHAROENWIWAT *et al.*, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.1. MATERIAIS

A lipase utilizada como biocatalisador tem de origem microbiana, proveniente da bactéria *Burkholderia cepacia*. Foi adquirida comercialmente da empresa Sigma Co, St. Louis, MO, EUA, com atividade média de 2901,25 U/g enzima (sólido em pH 7,0) e teor de proteína de 0,0725 mg/mg sólido determinados experimentalmente de acordo com os itens 4.2.3.1 e 4.2.3.4, respectivamente. O precursor utilizado para a obtenção da sílica foi o tetraetilortossilicato-TEOS ($C_8H_{20}O_4Si$) com pureza de 98%, adquirido da Sigma Aldrich Co (Milwaukee, WI, EUA), enquanto que o líquido iônico prótico C_5 (Pentanoato N-metilmonoetanolamônio), gentilmente cedido pela Dr^a Silvana Matedi do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia.

Os outros reagentes utilizados foram: Hexano p.a., 99% (Synth, Brasil); Hidróxido de Amônio p.a., 27% (Synth, Brasil); Etanol comercial, 99,5% (Synth, Brasil); Dióxido de carbono (White Martins, Brasil), 99% de pureza na fase líquida; Solução de Karl Fisher isenta de Piridina (Merck, Alemanha); goma arábica em pó, pura (Synth, Brasil); Albumina bovina (Inlab, Brasil). O substrato utilizado para as reações de hidrólise foi o azeite de oliva comercial extra virgem com baixa acidez (Carbonell). O substrato para a reação de transesterificação para obtenção de ésteres etílicos foi o óleo de coco bruto misturado com o etanol, enquanto que para a reação de esterificação para obtenção de bioemulsificante o substrato utilizado foi ácido palmítico em mistura com o álcool cetílico (Sigma-Aldrich Co. LLC). Todos os demais reagentes utilizados são de grau analítico.

4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste tópico serão abordadas as metodologias utilizadas para a obtenção do Aerogel (Aerogel-Controle) e sua modificação com líquido iônico (Aerogel-LI), para utilizar como suporte na imobilização da LBC por adsorção física e assim obter os derivados imobilizados nos seus respectivos carregamentos otimizados (BI-Controle e BI-LI-OTM), e por seguinte

poder avaliar o potencial e otimização dos parâmetros estudados conforme apresentado no esquema das etapas envolvidas da Figura 12.

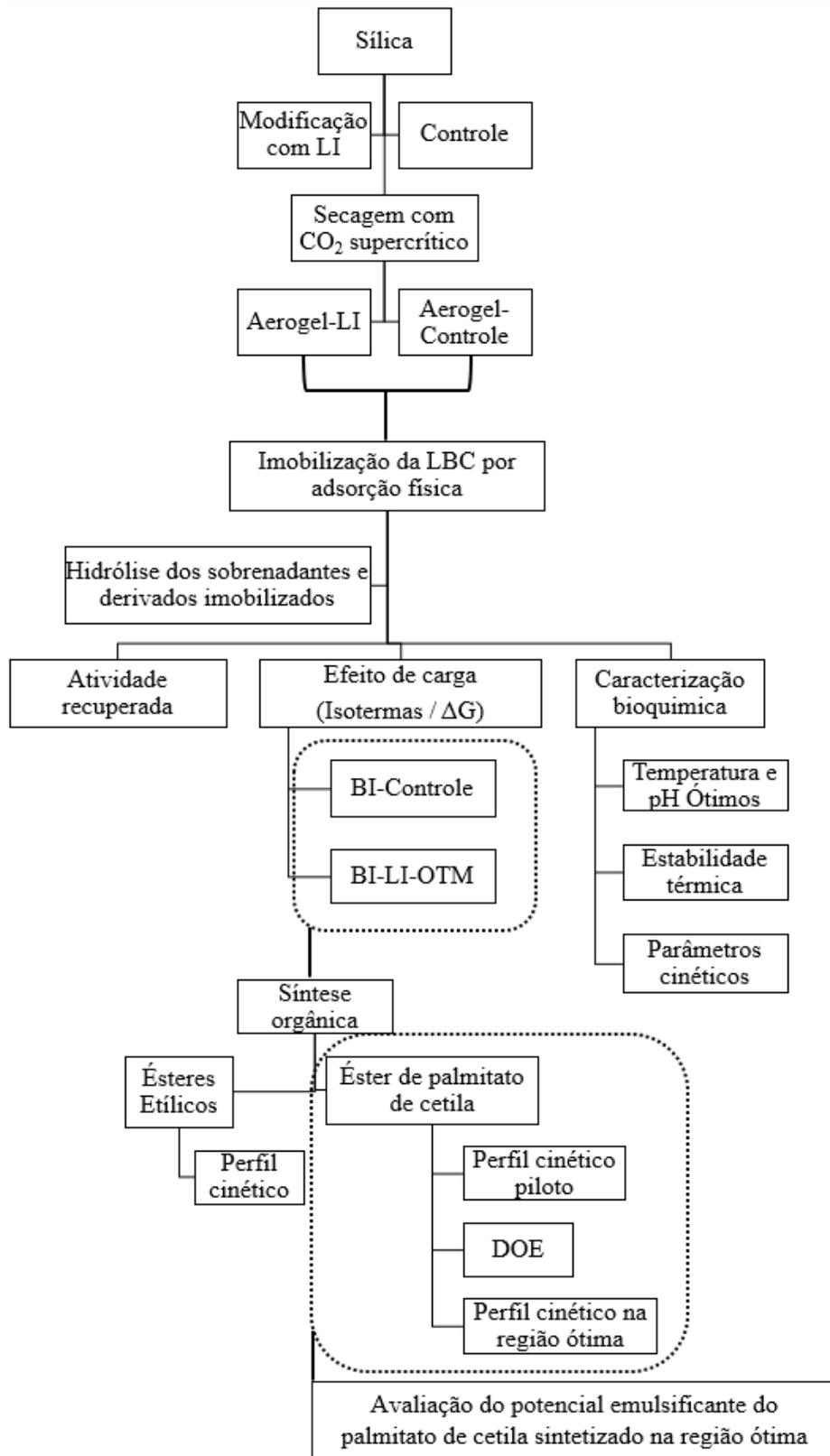


Figura 12. Esquema representativo das etapas envolvidas neste estudo.

4.2.1. Produção do aerogel

O aerogel foi preparado de acordo com a metodologia estabelecida por BARBOSA *et al.*, (2016), onde primeiramente formou-se a matriz sol-gel, seguido da modificação da matriz com líquido iônico e de sua secagem utilizando dióxido de carbono supercrítico.

4.2.1.1. Formação da matriz Sol-Gel e a sua modificação com Líquido Iônico

A formação da matriz sol-gel ocorre através de reações de hidrólise e policondensação do precursor tetraetilortossilicato (TEOS) onde este deverá ser manipulado durante a preparação das soluções em ambiente de atmosfera inerte de N₂, como demonstrado na Figura 13. Inicialmente, o TEOS foi diluído em etanol absoluto (99%) e a solução etanólica foi transferida para um balão de três bocas de 250mL. O sistema foi imerso em banho de glicerina na temperatura de 37°C enquanto submetido a agitação magnética. No balão de três bocas adicionou-se lentamente por meio de funil de adição, 0,22mL de ácido clorídrico (36%) diluído em 5mL de água ultrapura (solução pré-hidrolisante). As quantidades de água, tetraetilortossilicato e ácido clorídrico foram calculadas obedecendo a proporção molar: água:TEOS:HCl (1:1:1,5). Após a adição completa da solução pré-hidrolisante, a temperatura foi mantida a 35°C sob agitação durante 90 min. Após transcorrido o tempo, foi adicionado líquido iônico no caso do preparo da matriz modificada com líquido iônico (1% v/v) (SOUZA *et al.*, 2013).

Por último, adicionou-se lentamente no sistema através de um funil de adição uma solução contendo 2mL de hidróxido de amônio (28%) diluída em 12mL de etanol absoluto (solução hidrolisante, 1:6), obtendo assim obtido um material homogêneo e transparente permanecendo então em repouso à temperatura de 35°C durante 60 min e então estocada por 24h à 4°C, finalizando assim o processo de policondensação da sílica. Após este período, o gel foi retirado do balão de três bocas, após 24h de gelação. O material foi transferido para um funil de Büchner e lavado com hexano 3x60mL. Após a lavagem o material foi submetido a uma secagem utilizando dióxido de carbono supercrítico de acordo como descrito no item seguinte.

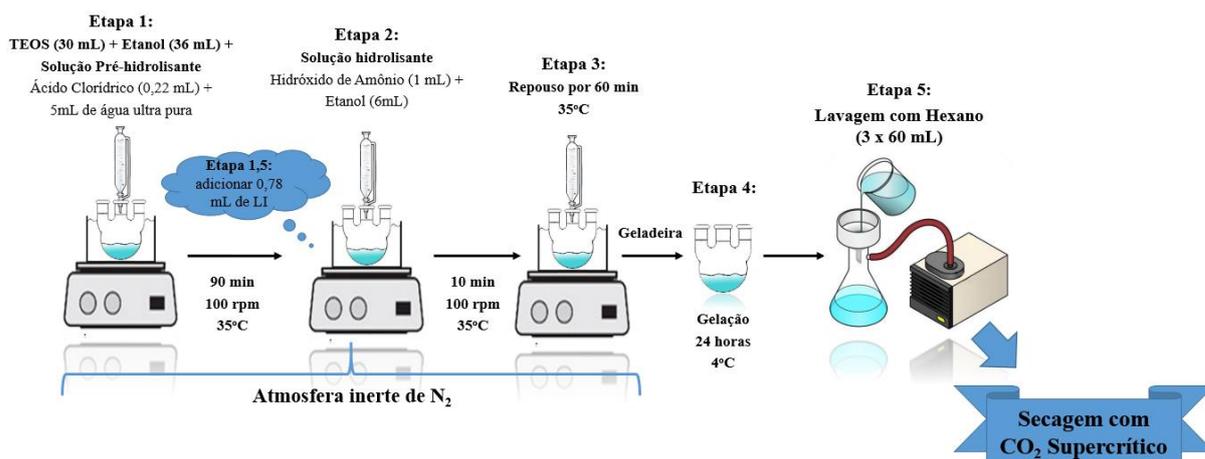


Figura 13. Aparato experimental para a formação da matriz sol-gel e a sua modificação com líquido iônico.

4.2.1.2. Secagem com dióxido de carbono supercrítico

Primeiramente, a matriz sol-gel previamente preparada é inserida no extrator onde ocorre o processo de secagem empregando o CO₂ supercrítico com vazão controlada manualmente de 2 mL/min nas condições operacionais de 100bar e 25°C por 6h, conforme estudo prévio realizado por BARBOSA *et al.*, (2016). Após transcorrido o tempo, o extrator é despressurizado, o aerogel é coletado, macerado e armazenado em temperatura ambiente para posterior uso.

O CO₂ armazenado no cilindro de gás passa pela linha para a bomba de alta pressão do tipo seringa com o fluxo sendo controlado por uma válvula do tipo esfera. A bomba tem a temperatura controlada pelo banho ultratermostático de recirculação, este tipo de bomba possui um cilindro interno com capacidade de aproximadamente 500mL, pressão de trabalho de até 258bar e vazão máxima de 170mL/min, permitindo operação tanto à pressão quanto à fluxo constante.

O fluido CO₂ pressurizado a 100bar em 25°C passa pela linha com destino ao extrator onde ocorre o processo de secagem tendo o fluxo controlado por uma válvula de uma via, permitindo que o fluxo tenha um único sentido impedindo que haja refluxo do extrator para a bomba e consequente contaminação do fluido que está armazenado na bomba. A pressão de chegada ao extrator é monitorada por um transdutor de pressão de volume zero que é conectada a linha e ao extrator por uma união do tipo T, os valores de pressão são coletados

por um indicador universal que recebe o sinal do transdutor de pressão, indicado assim a pressão do extrator e da linha adjunta ao extrator.

No extrator, a matriz sol-gel foi previamente inserida pela abertura superior onde a tampa possui comunicação com a linha de entrada por conexões do tipo metal-metal onde foi inserido filtro de aço sintetizado para evitar o arraste de material sólido para a linha. A temperatura na camisa do extrator foi controlada utilizando um banho ultratermostático de recirculação assegurando a manutenção da temperatura experimental desejada de 25°C.

A parte inferior do extrator foi tampada de maneira análoga a parte superior, porém conectada a uma linha possibilitando a saída do fluido CO₂ utilizado para secar o material com vazão controlada por uma válvula métrica tipo agulha. A válvula agulha possui uma abertura gradual tornando possível controlar manualmente a vazão do CO₂ na bomba tipo seringa no interior do extrator bem como a despressurização da mistura na saída do extrator, assim como também é possível a coleta do material extraído da matriz Sol-Gel (aerogel em formação). No entanto, existe a necessidade que a conexão T que liga a linha, a válvula e o extrator seja envolta por uma fita de aquecimento para impedir o seu congelamento devido ao efeito Joule-Thompson onde na expansão do CO₂ a temperatura diminui rapidamente. A temperatura na fita de aquecimento foi mantida a 80°C e monitorada por um termopar tipo J inserido entre o corpo da válvula e a fita de aquecimento, onde o sinal é coletado por um controlador de temperatura. O aparato experimental utilizado no procedimento é demonstrado na Figura 14.

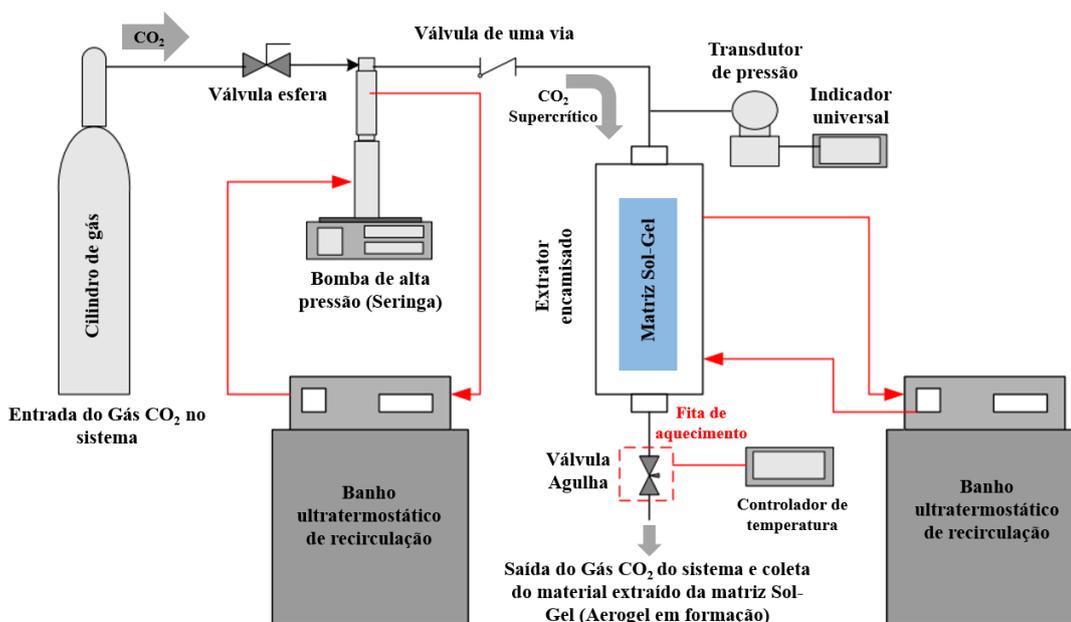


Figura 14. Equipamento utilizado para a consecução dos experimentos de secagem do sol-gel empregando CO₂ pressurizado. Fonte: BARBOSA *et al.*, (2014), com algumas modificações.

4.2.2. Imobilização por adsorção física

O procedimento é demonstrado na Figura 15 consistindo no contato de 10mL de hexano com 1g de aerogel (suporte) em um sistema com agitação vigorosa em temperatura ambiente durante 15min, em seguida, 10mL da solução enzimática (LBC) aquosa solubilizada em 10 ml de solução tampão fosfato pH 7,0 e 50 mM foi inserida ao sistema e permaneceu em agitação por mais 3h. Após o término do período de agitação, o sistema imobilizado foi mantido em incubação por 24h a 4°C, conforme BARBOSA *et al.*, (2016). A lipase imobilizada foi recuperada por filtração à vácuo e o biocatalisador imobilizado lavado com hexano (três lavagens com 20mL cada). Os filtrados foram analisados quanto à atividade enzimática na reação de hidrólise do azeite de oliva. Os teores de água dos biocatalisadores (peso seco) e as atividades enzimáticas foram determinadas conforme descritos nos itens 4.2.3.2 e 4.2.3.1.

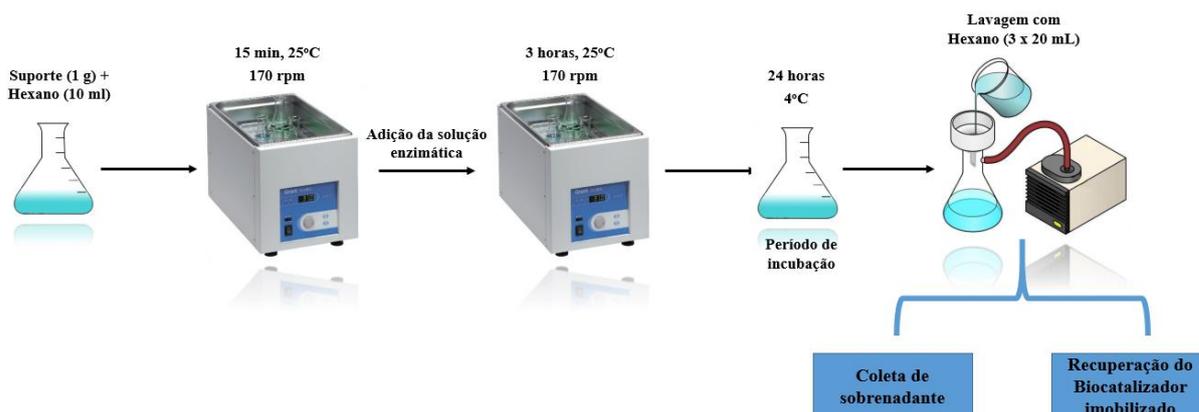


Figura 15. Aparato experimental para execução da imobilização da LBC em aerogel por ligação covalente.

4.2.3. Métodos analíticos

4.2.3.1. Atividade de Hidrólise do azeite de oliva

A atividade enzimática das lipases nas formas livre e imobilizada foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por SOARES *et al.*, (1999), com algumas modificações. O substrato foi preparado pela emulsão de 50mL de azeite de oliva e 50mL de goma arábica a 7% em solução tampão fosfato de

sódio (100mM, pH 7,0). Em frascos Erlenmeyer de 125mL foram adicionados: 5mL de substrato, 2mL de solução tampão fosfato de sódio e 0,1g de lipase. Os frascos serão incubados a 37°C por 5min para a enzima livre, 10min para o biocatalisador imobilizado em banho termostatizado com agitação vigorosa. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 2mL de uma mistura de acetona, etanol (99%) e água destilada (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,04N, utilizando fenolftaleína como indicador (3 gotas). Os cálculos foram realizados pela Equação 10 onde uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em U/g.

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{(V_A - V_B) * N_{KOH} * 10^3}{t * m} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

m = Massa de enzima livre ou imobilizada (pó) (mg);

N_{KOH} - Normalidade da solução de KOH (N);

t = tempo de reação (min);

V_A = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_B = Volume do KOH gasto na titulação do controle (mL).

4.2.3.2. Teor de água

A determinação do teor de umidade dos biocatalisadores imobilizados foi realizada pelo método volumétrico baseado na aquimetria do reagente Karl Fischer quantificado por titulação em 830 KF Titrino Plus (Metrohm) com um distribuidor 803 Ti Stand. O teor de umidade foi estimado tomando como base a quantidade de reagente (com o respectivo fator de correção) necessária para titular a água presente na alíquota da amostra.

4.2.3.3. Recuperação da atividade

A recuperação de atividade (RA (%)) será calculada pela Equação 11.

$$RA(\%) = \frac{U_s}{U_0} * 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

U₀ = Unidades de atividade oferecidas para a imobilização;

U_s = Unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa de biocatalisador imobilizado – base seca).

4.2.3.4. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford utilizando albumina do soro bovino como um padrão.

4.2.3.5. Efeito da carga enzimática inicial: Isotermas de adsorção e estudo termodinâmico

Nesse estudo foi analisado o equilíbrio de adsorção da solução enzimática e o aerogel no procedimento de imobilização por adsorção física descrito acima (item 4.2.2) utilizando vários carregamentos de enzima (de 100 até 5000 U/g suporte) possibilitando assim estudar a saturação de enzima no suporte. Os modelos matemáticos utilizados para ajustar os resultados experimentais foram Langmuir, Freundlich, Redlich-perterson e Sips de acordo com as Equações 3,4, 5 e 6 respectivamente utilizando o programa Origin® 8,0 para o cálculo dos seus respectivos parâmetros.

A aplicabilidade dos modelos de isotermas para descrever o processo de adsorção, além do coeficiente de correlação (R^2), também foi validada pelo erro médio relativo (EMR), conforme descrito na Equação 12.

$$EMR = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{Q_t^{exp} - Q_t^{calc}}{Q_t^{exp}} \right|_i \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

Q_t^{exp} = Carregamento obtido experimentalmente da lipase imobilizada no suporte;

Q_t^{calc} = Carregamento calculado pelo ajuste dos modelos matemáticos da lipase imobilizada no suporte;

N = Número de amostras.

O estudo termodinâmico foi realizado pelo cálculo da energia livre de gibbs (ΔG) do processo de adsorção da enzima no suporte utilizando a Equação 9 para todos os carregamentos utilizados para a formulação das isotermas de adsorção com o objetivo de demonstrar a variação a aleatoriedade do processo.

4.2.4. Caracterização bioquímica na hidrólise

A lipase da *Burkholderia Cepacia* (LBC) foi imobilizada por adsorção física no suporte controle (Aerogel-Controle) e no suporte modificado com líquido iônico (Aerogel-LI) de acordo com o item 4.2.2. no carregamento proposto por BARBOSA *et al.*, (2016) (300 mg/g_{suporte}), e então os biocatalisadores imobilizados em Aerogel (BI-Controle) e em aerogel modificado com líquido iônico (BI-LI) e a LBC livre foram caracterizados quanto à sua atividade em função do pH e da temperatura, estabilidade térmica, assim como foram determinadas as constantes cinéticas K_m e V_{max} , através da reação de hidrólise do azeite de oliva (item 4.2.3.1)

4.2.4.1. Atividade em função do pH e da Temperatura

As atividades do BI-Controle e BI-LI foram estudadas na faixa de pH entre 5,0 a 9,0 enquanto que a influência da temperatura foi determinada nas temperaturas de 30 a 70°C, em pH 7,0.

4.2.4.2. Estabilidade Térmica

O efeito da temperatura na estabilidade dos biocatalisadores foram determinados por meio da incubação de 0,1g de sua massa seca a 40°C em meio-aquoso (0,1M tampão fosfato, pH 7,0) até atingir menos de 50% de sua atividade residual que foi determinada a 37°C por 10min na reação de hidrólise do azeite de oliva.

4.2.4.3. Parâmetros Cinéticos

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m) foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando entre 37 a 1860mM, obtidos a partir de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva (1 a 60%) e solução aquosa de goma arábica (7% p/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pelos biocatalisadores imobilizados foram determinadas de acordo como o descrito no item 4.2.3.1. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados com o auxílio do programa Origin® 8,0.

4.2.5. Produção de ésteres etílicos

As reações de transesterificação para obtenção de ésteres etílicos foram conduzidas em frascos hermeticamente fechados imersos em banho termostaticado com agitação de 150rpm empregando-se óleo de coco bruto como fonte de triglicerídeos e etanol como álcool na proporção de 1:7 à 40°C contendo 20% m/m de biocatalisador em um sistema isento de solvente de acordo com o proposto por OLIVEIRA et al., 2014.

Os experimentos foram executados em batelada variando o tempo reacional com os biocatalisadores utilizando o carregamento enzimático de imobilização proposto por BARBOSA *et al.*, (2016) (BI-Controle e BI-LI com 300mg/g_{suporte}, cada), assim como utilizando o carregamento adquirido pelo modelo matemático que melhor se ajustou no item 4.2.3.5 (BI-LI-OTM) objetivando a validação da otimização na reação de síntese. Ao final da reação a mistura foi centrifugada por 2 minutos para separação da enzima/produto. As amostras foram lavadas por 3 vezes com solução saturada de NaCl para remoção do glicerol formado. Os ésteres etílicos de ambas as fases (aquosa e orgânica) foram extraídas com Hexano. A fase orgânica foi purificada com Na₂SO₄ anidro.

Os ésteres etílicos formados foram analisados por cromatografia gasosa (Shimadzu GC 2010) equipado com o detector de massa GCMS-QP2010 Plus e coluna ZB-5MS. As varreduras da espectrometria de massas foram realizadas utilizando os modos Scan (analisa todos os íons presentes em uma amostra), MIC (Corrente de Íons Monitorados, ferramenta do software que seleciona apenas os picos de interesse da análise feita com o Scan, fazendo um novo cromatograma com os íons de interesse) e o modo SIM (Monitoramento do íon selecionado, detectando apenas os íons selecionados pelo operador). O Hélio foi utilizado como gás transportador, com vazão de 33,6 mL/min utilizando a temperatura programada. A temperatura da coluna foi mantida constante à 115°C por 0,5 min, aquecida até 260°C na taxa de 8°C/min e mantida constante por 5 min. Além disso, a temperatura foi programada de 25°C/min para 170°C e mantida constante por 15 minutos. As temperaturas do injetor (AOC-20i) e detector foram de 260°C. A coleta de dados e análises foram realizadas com o programa GCMS Postrun Analysis (Lab solutions). As curvas de calibração foram construídas a partir de ésteres etílicos convencionais usando Heptanoato de metila como padrão interno (250 ppm). O rendimento da transesterificação foi calculado levado em

consideração massa do éster detectada pela análise GC e a massa total teórica do éster com base na proporção molar da reação.

4.2.6. Produção de palmitato de cetila

A produção do palmitato de cetila foi realizada de acordo com a metodologia descrita por LOPES *et al.*, (2011) com modificações. As reações de esterificação foram conduzidas em reatores fechados em agitador orbital, onde álcool cetílico foi misturado com o ácido palmítico em diferentes razões molares, diluído em hexano (3mL de meio reacional), variando a proporção de enzima empregada e a temperatura reacional, de acordo com um planejamento composto central rotacional demonstrado na Tabela 5. A variável tempo reacional (h) foi estudada separadamente antes do estudo do planejamento experimental retirando alíquotas periodicamente do ponto central para identificação do menor tempo de conversão máxima, para assim deixar fixado em todo planejamento experimental e foi testada novamente no ponto de conversão máxima do planejamento proposto.

Tabela 5. Codificação das variáveis para elaboração da matriz do planejamento proposto

Variável	Nível				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	35	41	50	59	65
Mol de álcool para 1 mol de ácido	0,5	0,7	1	1,3	1,5
Percentual de enzima (%) (m/m)	2	5,2	10	14,8	18

Inicialmente, o substrato foi homogenizado em temperatura acima de 40°C, para depois ser aplicado nas reações de síntese. Foram coletadas alíquotas de 100µL do meio reacional e foram diluídas em 10 mL de acetona-etanol (1:1). A conversão do éster foi calculada medindo a concentração de ácido residual na mistura reacional, que foi determinada por titulação com NaOH 0,04 N, utilizando como indicador fenolftaleína. As reações em branco foram realizadas através da coleta da liquota antes da adição do biocatalisador. Sendo assim, a porcentagem de esterificação foi calculada como descrito pela Equação 13:

$$\% \text{ Esterificação} = \frac{V_0 - V_E}{V_B} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

V_0 = Volume gasto de NaOH na titulação do branco;

V_E = Volume gasto de NaOH na titulação na amostra com enzima.

4.2.6.1. Potencial emulsificante em diferentes substratos

O palmitato de cetila sintetizado pela reação de esterificação descrita acima, foi submetido a tratamento térmico para evaporação do excesso de solventes no meio reacional para depois ser submetido ao teste de poder emulsificante. A potencial emulsificante foi determinado segundo metodologia descrita por JOHNSON *et al.*, (1992), onde o potencial emulsificante do palmitato de cetila foi avaliado e comparando com o potencial de outros emulsificantes, tais quais o Tween 40, Tween 80 e o Triton x-100. O ensaio foi realizado utilizando 3,5 mL de solução de emulsificante em água na proporção 3:4, adicionado de 2,0 mL do substrato a ser emulsificado (óleo de coco bruto, óleo de coco bruto extra virgem e hexano). A amostra foi aquecida e então agitada em vortex a 700rpm por 1min e então permaneceu em repouso à 50°C por meia hora, 1h e por 24h. Após o repouso, foi aferida a diferença entre a altura total de óleo e a altura de óleo emulsificado. Sendo assim, foi definido como uma unidade de atividade emulsionante água/óleo ($AE_{a/o}$) o volume de emulsificante necessário para estabilizar a emulsão de 1% de fase hidrofóbica durante 24h de acordo com o descrito pela Equação 14. As atividades de emulsão de água-em-óleo foram classificadas qualitativamente de acordo com o estabelecido por JACKISCH-MATSUURA *et al.*, (2014), com base na altura da emulsão formada como alta ($\geq 1,8$ cm), moderada (1 a 1,7 cm) e baixa (<1 cm).

$$AE_{a/o} = \frac{E * D}{v_a(1 - u)}$$

Equação 14

Onde:

$AE_{a/o}$ = atividade emulsificante água em óleo (UE/g);

E = relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total;

D = diluição da amostra em água;

v_a = volume da amostra emulsificada (mL); u = teor de umidade do meio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Primeiramente deve-se ressaltar que o presente trabalho objetiva a continuidade dos trabalhos do grupo de pesquisa dos Laboratórios de Pesquisa em Alimentos e em Engenharia de Bioprocessos alocados na Universidade Tiradentes como componentes do Instituto de Tecnologia e Pesquisa em Aracaju/SE. Tais trabalhos geraram publicações que guiaram várias escolhas, tais quais a seleção líquido iônico (SOUZA *et al.*, 2013) como agente modificador do aerogel, a metodologia aplicada para a secagem da sílica para obtenção do aerogel (BARBOSA *et al.*, 2014) assim como também a técnica de imobilização selecionada (BARBOSA *et al.*, 2016) para obtenção dos biocatalisadores.

O presente trabalho se divide em três etapas, na primeira etapa será discutido o processo de obtenção de um carregamento enzimático ótimo para cada tipo de aerogel, seja ele com modificação (Aerogel-LI) ou sem modificação (Aerogel-Controle) utilizando modelos matemáticos de adsorção (FOO e HAMEED, 2010), para a obtenção de um biocatalisador imobilizado com aerogel sem modificação (BI-Controle) e com modificação (BI-LI) em sua capacidade máxima de adsorção dentro dos parâmetros preestabelecidos por BARBOSA *et al.*, (2016), utilizando como reação padrão a hidrólise do azeite de oliva (SOARES *et al.*, 1999). Na segunda etapa, os biocatalisadores derivados da triagem realizada na primeira etapa foram submetidos a caracterização bioquímica visando estabelecer as possíveis modificações nas interações lipase/suporte a sua modificação. Na terceira etapa tanto o BI-Controle como o BI-LI foram submetidos a reações de síntese orgânica de grande valor agregado industrial, como a produção de ésteres etílicos com vistas a aplicação na indústria de biocombustíveis e a produção de palmitato de cetila na indústria de cosméticos.

5.1. Otimização do processo de imobilização por adsorção física

Nesta seção analisaremos a saturação do Aerogel-Controle e do Aerogel-LI a partir da reação padrão do azeite de oliva, já bem estabelecida em diferentes trabalhos publicados em periódicos de alto impacto. Recentemente vem-se trabalhando com modelos matemáticos de adsorção para auxiliar na seleção do carregamento de lipase nos mais variados tipos de suporte. No entanto, é comumente utilizado como parâmetro de análise a concentração de

proteína desaparecida do biocatalisador pelo método de Bradford (LAGE *et al.*,2016; MIRANDA *et al.*,2014 e SILVA *et al.*, 2017). Por se tratar da aplicação de um biocatalisador sem purificação prévia, no presente trabalho optamos por realizar como parâmetro a determinação das Unidades de lipase não adsorvidas, ao invés da determinação de proteínas no decorrer do processo de imobilização pois a análise fica comprometida devido a grande concentração de impurezas no sobrenadante impedindo a detecção por meio espectroscopia. A utilização de Unidades como parâmetro de análise na adsorção no processo de imobilização de enzima também já foi abordada em outros trabalhos da literatura conforme descrito por AL-DURI *et al.* (2000) e RAMANI *et al.* (2012).

5.1.1. Recuperação da atividade

De acordo com o demonstrado na Figura 16, com o aumento da carga de enzima aplicada na imobilização por adsorção física de 100 até 5000U/g_{suporte}, há uma tendência para a redução do rendimento de imobilização. Isso pode ser explicado em função da diminuição de espaço oferecido no suporte para acomodação da enzima adsorvida, consequentemente acarretando na diminuição da eficiência da imobilização para ambos o suporte controle e modificado.

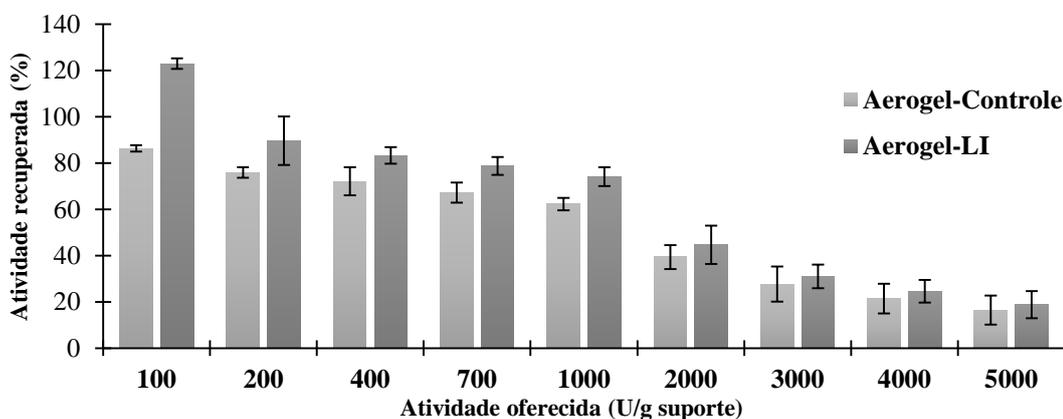


Figura 16. Demonstração do decréscimo da eficiência de imobilização com o aumento da carga de enzima no processo de imobilização por adsorção física

Pode-se observar também que os valores entram em conformidade com o descrito por BARBOSA *et al.*, (2016), onde cerca 870,71U/g_{suporte} (cerca de 300mg de LBC para 1 grama de suporte) foi oferecido para as imobilizações realizadas obtendo-se para adsorção física um

rendimento de imobilização de 70% para o Aerogel-Controle e 83% para o Aerogel-LI. Ligeira variação no carregamento pode ser decorrente da variação do lote da LBC utilizada.

Observa-se também que o Aerogel-LI demora mais para atingir a saturação, isso ocorre, pois, a área superficial e o volume do poro do suporte modificado é maior do que a do controle, fato descrito por BARBOSA *et al.*, (2016), onde indica-se que o líquido iônico influencia positivamente as propriedades físicas do suporte, tornando este aditivo uma alternativa interessante para o controle do tamanho de poro da sílica aerogel. Comportamento similar de controle das propriedades texturais da sílica é demonstrado por Al-Duri e Yong (2000), em que a LBC foi adsorvida em Accurel EP100 e em 45SAA. O Accurel EP100 é um material de polipropileno com natureza hidrofóbica e o 45SAA é uma sílica modificada com o polipropileno, estabelecendo um equilíbrio entre a natureza hidrofílica da sílica e hidrofóbica do polipropileno, resultando numa maior área superficial e aumento na capacidade de adsorção da LBC de 140 a 260 U/g_{suporte}. A escolha do método de secagem fez com que aumentasse a capacidade de retenção da lipase na sílica, e este perfil foi também observado após a modificação da sílica aerogel com LI, cujo o carregamento próximo de 1000 U/g_{suporte} (Figura 16).

A imobilização completa e a hiperativação (atividade recuperada acima de 100%, Figura 16) da LBC utilizando suporte quimicamente modificado é observada mais facilmente com a aplicação da carga de lipase mais baixa, onde o espaço oferecido para a acomodação da lipase é maior, devido a menor quantidade de lipase oferecida, tornando mais evidente a sua afinidade com o suporte. Ainda deve-se salientar que este aumento da afinidade da LBC com o suporte se deve provavelmente ao possível aumento da hidrofobicidade da superfície do suporte após modificação com LI, uma estratégia importante na preparação de biocatalisadores ativos preparados por adsorção física.

GAO *et al.*, (2009) demonstra a adsorção da lipase *Candida rugosa* na superfície do aerogel modificado com grupo metil onde a máxima retenção da atividade enzimática foi de 56,44%, enquanto que KHARRAT *et al.*, (2011) realizou a imobilização da lipase *Rhizopus oryzae* no aerogel sem modificação atingindo uma atividade recuperada de 80% na conversão de oleato de butila. Assim, conclui-se que a sílica aerogel modificada com líquido iônico prótico permite uma melhor retenção da atividade no processo de imobilização a lipase por adsorção física. Nesse contexto, se faz necessário a avaliação da carga ótima para a imobilização de ambos os biocatalisadores utilizando modelos matemáticos consolidados na literatura para obter um biocatalisador de eficiência e estabilidade máxima, evitando uso

desnecessário de uma concentração elevada (ou baixa) de oferecimento de lipase livre para imobilização.

5.1.2. Efeito da carga enzimática inicial: Isotermas de adsorção e estudo termodinâmico

Como pode ser observado na Tabela 6, o aumento da carga inicial da lipase aumentou a atividade hidrolítica dos biocatalisadores, como esperado. A atividade hidrolítica máxima para aerogéis de sílica não modificados e quimicamente modificados foi 1015,6 e 1224,4U/g_{biocatalisador} utilizando a carga inicial de enzima de 4000U/g_{suporte} com valores de saturação do suporte experimental sendo expressas por Q_e obtendo 863,5U/g_{suporte} para o Aerogel-Controle e 977,7U/g_{suporte} para o Aerogel-LI. Apartir desses dados nota-se que o suporte modificado retém mais unidades de lipase capazes de hidrolizar 1 μ mol de ácido graxo na reação de hidrólise do azeite de oliva. O aumento da carga de lipase subsequente, foi observada uma diminuição da atividade hidrolítica devido ao acesso restrito de moléculas de substrato a superfícies do biocatalisador externo e interno.

Por outro lado, pode-se observar uma diminuição na espontaneidade do processo de adsorção provavelmente devido à redução da área de superfície do suporte disponível para adsorver moléculas enzimáticas (saturação de suporte). Os valores negativos para o ΔG aparente mostram que a adsorção da LBC foi um processo espontâneo.

Comportamento similar da adsorção da lipase em superfícies hidrofóbicas é demonstrado por ALVES *et al.*, (2016) e MIRANDA *et al.*, (2014), onde os suportes hidrofóbicos foram: Poly-(styreno-divinilbenzeno) e Polihidroxibutirato, respectivamente. Além disso, os valores de ΔG mostram que o procedimento de imobilização da LBC sobre o suporte ocorreu por adsorção física. Estes resultados mostram claramente que a aplicação de aerogéis de sílica modificados com LI apresentou maior capacidade de imobilizar a LBC em comparação com o aerogel de sílica não modificado (controle). Isto é possivelmente devido à sua maior hidrofobicidade, tal como acima descrito, e aumento da área de superfície após modificação química (de 81 para 322 m²/g) que melhora a adsorção de lipase na superfície de suporte e acessibilidade de substratos hidrofóbicos (gotículas de óleos) ao microambiente biocatalisador. Deste modo, a carga inicial de lipase de 4000U/g_{suporte} foi mais do que o suficiente para preparar biocatalisadores ativos com um rendimento de imobilização de 20% (Figura 16). No entanto, a utilização de 4000 U/g_{suporte} como carga inicial é inviável devido ao seu baixo rendimento de imobilização, que gera um processo dispendioso.

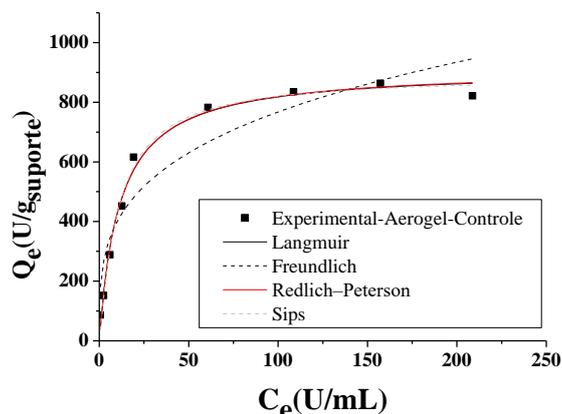
Tabela 6. Influência da carga inicial de lipase sobre a atividade hidrolítica e os valores aparentes da energia livre de Gibbs para a adsorção física da LBC em partículas de aerogel e em aerogel modificado com líquido iônico.

Atividade Oferecida	Atividade hidrolítica		C_e	Q_e	ΔG			
	U/g biocatalisador							
	U/g suporte	Aerogel	Aerogel-LI	Aerogel	Aerogel-LI	Aerogel	Aerogel-LI	Aerogel
100	89,2	171,9	0,6	0,1	86,4	98,8	-12,3	-16,6
200	170,5	179,5	2,4	1,6	151,9	167,9	-10,3	-11,5
400	242,7	407,3	6,0	3,4	288,6	331,5	-9,6	-11,3
700	443,9	643,4	12,6	8,2	452,3	536,8	-8,9	-10,4
1000	645,1	879,5	19,2	12,9	615,9	742,1	-8,6	-10,0
2000	804,5	1075,5	60,9	55,3	782,7	893,9	-6,3	-6,9
3000	839,6	1274,6	108,7	104,2	835,1	916,4	-5,1	-5,4
4000	1015,6	1224,4	157,2	151,2	863,5	977,7	-4,2	-4,6
5000	966,1	1199,8	208,7	203,4	821,4	933,6	-3,4	-3,8

Então, para otimização do processo de imobilização com um melhor custo/benefício, convém-se imobilizar oferecendo como carregamento inicial o carregamento de saturação, no caso 863,5 e 977,7 U/g_{suporte} para o Aerogel-Controle e o Aerogel-LI, respectivamente. Para melhor entendimento da natureza do processo, também convém-se ajustar os pontos experimentais a modelos matemáticos de adsorção, como demonstrado na Figura 17 (a) e (b).

Os dados experimentais foram ajustados aos modelos isotermicos de Langmuir, Freundlich, Redlich-Peterson e Sips, com auxílio da ferramenta “Nonlinear curve fit” do programa Origin 8. Os valores dos coeficientes de cada equação, tais quais a capacidade máxima de adsorção de lipase pelo suporte predita pelo respectivo modelo, os coeficientes de correlação (R^2) e erro médio relativo (EMR) estão descritos na Tabela 7.

(a)



(b)

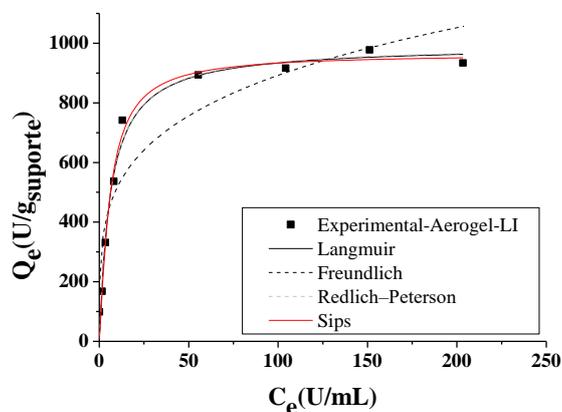


Figura 17. Modelos isotérmicos de adsorção para a adsorção da LBC em aerogel (a) e em aerogel modificado com líquido iônico (b).

A partir do valor de K_L é possível a obtenção dos valores de R_L de acordo com a Equação 7. Na Figura 18 é possível identificar que para a adsorção da LBC nas partículas do Aerogel-Controlle e no Aerogel-LI os valores de R_L variaram entre 0 e 1. Considerando esta região, sugere-se que a adsorção da LBC sobre os suportes foi mais favorável ao aumentar a concentração de lipase indicando à adsorção.

Comportamento semelhante é reportado por LAGE *et al.*, (2016) e por MIRANDA *et al.*, (2013), onde a lipase *Thermomyces lanuginosus* foi adsorvida em suporte com característica hidrofóbica como o polimetacrilato e poli-hidroxibutirato, respectivamente, cujo o perfil foi similar.

Tabela 7. Determinação dos parâmetros isotérmicos da adsorção da LBC no aerogel modificado com líquido iônico (Aerogel-LI) e no Aerogel-Controlado a 25°C.

Modelo Langmuir			Modelo Freundlich		
Equação	$Q_e = \frac{Q_{max} * C_e}{K_L + C_e}$		Equação	$Q_e = K_F * C_e^{(1/n)}$	
Suporte	Aerogel-Controlado	Aerogel-LI	Suporte	Aerogel-Controlado	Aerogel-LI
R²	0,99	0,97	R²	0,89	0,88
EMR	9,29	14,35	EMR	29,82	32,2
K_L	11,35	6,31	K_F	207,61	314,78
-	-	-	N	3,52	4,42
Q_{max}	910,67	993,42	Q_{max}	207,61	314,78
Modelo Redlich-Perterson			Modelo Sips		
Equação	$Q_e = \frac{K_{RP} * C_e}{1 + a * C_e^b}$		Equação	$Q_e = \frac{K_s * C_e^{B_s}}{1 + (a_s * C_e^{B_s})}$	
Suporte	Aerogel-Controlado	Aerogel-LI	Suporte	Aerogel-Controlado	Aerogel-LI
R²	0,99	0,97	R²	0,99	0,97
EMR	9,25	14,34	EMR	9,98	13,3
K_{RP}	80,15	157,15	K_s	65,83	106,7
A	0,09	0,16	a_s	0,07	0,11
B	1	1	B_s	1,09	1,24
Q_{max}	912,97	996,52	Q_{max}	891,26	960,21

Na Figura 18 nota-se um pequeno deslocamento na região de 0 a 100U/mL, entre o Aerogel-Controlado e no Aerogel-LI. A mudança de comportamento é devido a maior capacidade de adsorção do Aerogel-LI, pois quando o $R_L=0$ indica a irreversibilidade do processo de adsorção, com essa tendência de irreversibilidade, o comportamento é análogo a saturação do suporte do suporte em carregamentos muito elevados.

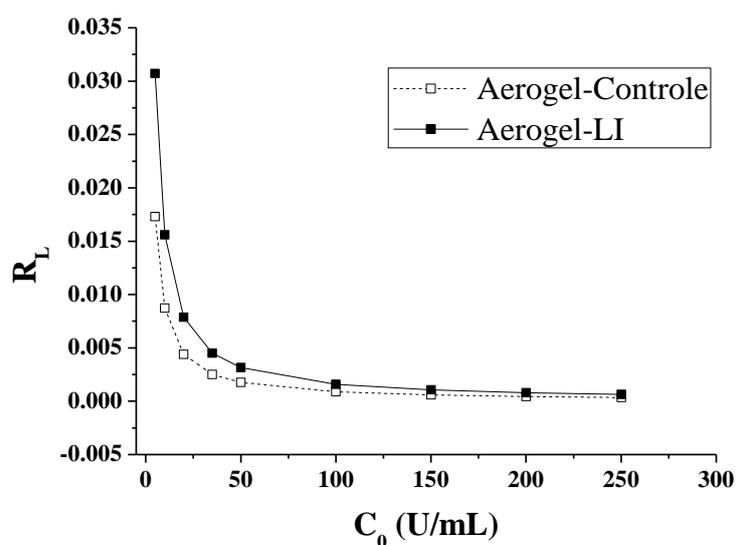


Figura 18. Relação entre o fator de separação (R_L) e a concentração inicial de lipase (C_0)

A concentração de 100 U/mL, é equivalente ao carregamento de 1000 U/g suporte, uma vez que a LBC foi diluída em 10 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7(100mM), a Figura 18 demonstra que a partir deste ponto a região de separação entre as curvas começa a diminuir até sobrepor nos carregamentos mais concentrados. Isso indica que os dois suportes, saturam numa região relativamente próxima e a partir do momento que a curva tende a uma linearidade à indícios de saturação total. A partir dos ajustes com os modelos matemáticos é possível pleitear um carregamento estratégico com melhor precisão.

Portanto, os modelos que melhor se ajustaram a cada situação estão apresentados na Figura 17 a e b na cor vermelha, como pode ser observado, o modelo isotérmico de Sips foi bem adaptado aos dados experimentais de imobilização de LBC sobre o Aerogel-LI, considerando seu maior coeficiente de correlação e o menor valor de EMR, seguido do modelo de Redlich-Perterson. Por outro lado, a adsorção da LBC no controle ajustou-se melhor ao modelo isotérmico de Redlich-Perterson.

De acordo com FOO e HAMEED (2010), os modelos de Redlich-Perterson e Sips são uma combinação entre os modelos de Langmuir e Freundlich. No qual o modelo de Redlich-Perterson se aproxima do descrito por Freundlich na região de alta concentração de lipase, enquanto que em baixa concentração se aproxima do modelo de Langmuir. Já o modelo de Sips preve que os sistemas de adsorção heterogêneos permitem contornar a limitação da concentração de suporte associada ao modelo de isoterma de Freundlich. Em baixas concentrações de lipase, reduz-se a isoterma de Freundlich, enquanto que a altas

concentrações de lipase, prevê uma capacidade de adsorção monocamada característica da isoterma de Langmuir.

Desta maneira, o Aerogel-LI em baixas concentrações de lipase, adsorveu de maneira aleatória as suas moléculas devido à alta disponibilidade de espaço, enquanto que em altas concentrações, ocorre uma distribuição em monocamada devido ao preenchimento deste espaço, também evidenciado por seu valor atrelado de energia livre de Gibbs (na faixa de -5kJ/mol, Tabela 6), decorrente de sua saturação. Enquanto que o Aerogel-Controlado tendeu a iniciar a sua adsorção em baixas concentrações de lipase já em monocamada e apenas depois do aumento da carga de lipase se comportou aleatoriamente. Tal comportamento evidencia que a modificação com líquido iônico faz com que o Aerogel adsorva de maneira mais seletiva as moléculas da lipase devido a sua maior disponibilidade de espaço e possível característica mais hidrofóbica.

BARBOSA *et al.*, (2016), evidencia a modificação utilizando o método de BET adsorvendo o gás nitrogênio sobre a superfície do Aerogel controle e Aerogel-LI. Foi observado que a modificação com líquido iônico acarretou em um aumento do tamanho de poro de 0,04cm³/g para 0,8cm³/g e de área de superfície de 81m²/g para 322m²/g, entrando em convergência com os dados apresentados no estudo isotérmico realizado no presente trabalho.

Contudo, para escolha do carregamento ótimo para imobilização da LBC em Aerogel-Controlado e em Aerogel-LI foi selecionado o carregamento de 977,7U/g_{suporte} para o Aerogel-LI e 863,5 U/g_{suporte} para o Aerogel-Controlado, por representarem experimentalmente a quantidade máxima de unidades de lipase que o suporte conseguiu adsorver no período de adsorção proposto por BARBOSA *et al.*, (2016), de acordo com o exposto pela Tabela 6, e ao mesmo tempo, por apresentar um satisfatório rendimento de imobilização para a adsorção física da LBC no Aerogel-controlado (61,57%) e Aerogel-LI (74,17%).

Em termos mássicos, a quantidade de lipase necessária para saturar o Aerogel-LI foi de cerca de 337mg/g_{suporte}, enquanto que para o aerogel controle foi de 297mg/g_{suporte}. Isso significa que a modificação com líquido iônico aumentou a capacidade de adsorção de lipase pelo aerogel em 11,7%. Sendo estes os carregamentos recomendados para a imobilização da LBC em Aerogel-Controlado e Aerogel-LI para obtenção de biocatalisadores estáveis e com rendimento de imobilização otimizado com vistas a sua caracterização bioquímica e aplicação na síntese de ésteres de interesse industrial de alto valor agregado.

5.2. Caracterização Bioquímica do biocatalisador imobilizado por adsorção física

A enzima LBC foi imobilizada em Aerogel-Controle e em Aerogel-LI e os derivados imobilizados, BI-Controle e BI-LI, respectivamente, foram submetidos à reação de hidrólise do azeite de oliva com variação de temperatura, pH, oferecimento de triglicerídeos (Cinética Michaelis-Menten) e incubados por longos períodos de tempo para testar a sua estabilidade térmica, objetivando avaliar o efeito da modificação com líquido iônico no biocatalisador imobilizado.

5.2.1. Estudo de pH e temperatura ótima

Os resultados demonstrados na Figura 19 revela que para ambos os biocatalisadores testados o pH ótimo reacional é 7. Como o pH ótimo reacional da LBC livre também é 7, o resultado indica que o processo de imobilização não influencia no pH de atuação dos biocatalisadores imobilizados em aerogel e em aerogel imobilizado modificado com líquido iônico.

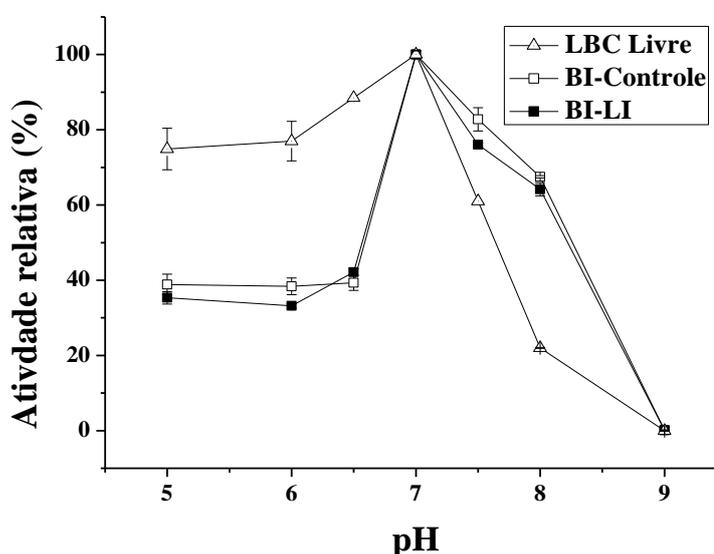


Figura 19. Teste de variação de pH reacional na hidrólise do azeite de oliva para a LBC imobilizada em aerogel e em aerogel modificado com líquido iônico

Também é possível observar que a modificação do aerogel com o líquido iônico não altera o comportamento do biocatalisador imobilizado quando submetido a variação de pH

no meio reacional, com atividade máxima obtida de cerca de 965,66U/g_{biocatalisador} para o BI-LI e 637,63U/g_{biocatalisador} para o BI-Controle.

Resultados para o pH ótimo de 7 para a LBC imobilizada também é reportado por MARTINS *et al.*, (2016), onde a lipase foi imobilizada em sílica híbrida de Poli(3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) modificada com líquido iônico. LI *et al.*, (2017) também relata que um ambiente neutro é benéfico para a recuperação da atividade da LBC imobilizada onde atingiu-se atividade relativa máxima havendo variação de pH entre 6 a 8. No que concerne da interação do aerogel com a lipase, KHARRAT *et al.*, (2011) reporta que a imobilização da lipase *Rhizopus oryzae* em aerogel não modifica o pH ótimo reacional quando comparado com a lipase livre.

Para a análise da temperatura ótima reacional houve uma modificação, pois, a LBC livre tem melhor atuação a 50°C enquanto que os biocatalisadores imobilizados na faixa ótima de 37-40°C, o que pode ser observado no perfil da temperatura apresentando na Figura 20. Portanto, para os biocatalisadores imobilizados obtém-se uma menor energia de ativação para a operação da enzima, este fator indica a possibilidade de custos menos onerosos para a aplicação na indústria devido o menor gasto de energia. Segundo SCHULTZ *et al.*, (2005) a condutividade térmica para o aerogel é baixa cerca de 0,005-0,1W/mK, desta forma pode-se sugerir que a manutenção da atividade relativa na região entre 45 e 60°C dos biocatalisadores imobilizados (BI-Controle e BI-LI) deve-se possivelmente a baixa condutividade térmica do aerogel protegendo a lipase da desnaturação em altas temperaturas. PENCREAC'H *et al.*, (1997) verificou que a atividade da LBC livre aumentou de 25°C para 45°C e manteve-se constante em 50°C, decrescendo em temperaturas altas, enquanto que o perfil da LBC imobilizada por adsorção física em polipropileno microporoso teve um comportamento similar na primeira parte da curva (entre 25°C e 45°C), porém houve um decréscimo na atividade após atingir a temperatura de 45°C, contudo o decréscimo em sua atividade não foi tão abrupta quando comparado a LBC livre. Comparando a condutividade térmica do polipropileno (0,17 W/mK) com a do aerogel (0,005-0,1W/mK) pode-se notar que o aerogel é mais eficiente como isolante térmico, protegendo melhor a lipase adsorvida da desnaturação (SCHULTZ *et al.*, 2005, PROTOLAB, 2018).

Resultados similares também foram reportados por MAURY *et al.*, (2005) em que LBC encapsulada em aerogel onde também teve um melhor desempenho na temperatura reacional de 40°C. GAO *et al.*, (2010a) reporta que a lipase *Candida rugosa* imobilizada em aerogel modificado com grupo metil também manteve melhor desempenho na temperatura de

40°C. A partir dos dados obtidos experimentalmente e comparando com os dados da literatura expostos, conclui-se que o aerogel diminui a energia de ativação da lipase imobilizada e modificações em sua estrutura não afeta tal propriedade.

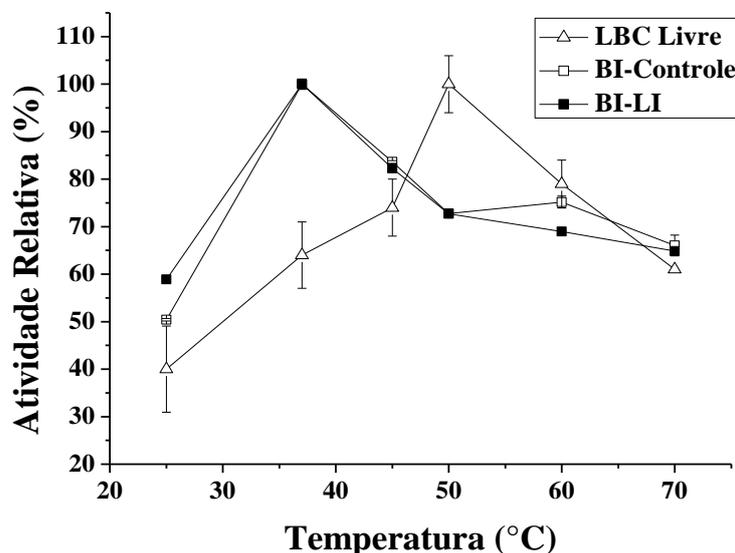


Figura 20. Influência da variação da temperatura na atividade de hidrólise da LBC imobilizada em aerogel (controle) e em aerogel-LI

Porém, de acordo com LIU *et al.*, (2011), quando a LBC é imobilizada em matrizes hidrofóbicas o efeito de temperaturas mais elevadas na quebra das interações responsáveis pela estrutura globular cataliticamente ativa da lipase torna-se menos evidente resultando no aumento da estabilidade térmica. Deste modo, se faz necessário a avaliação da estabilidade térmica desses biocatalisadores na temperatura ótima de trabalho em diferentes momentos de incubação devido principalmente a baixa condutividade térmica do aerogel, que protegeu os biocatalisadores imobilizados em reações de elevada temperatura.

5.2.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da LBC-Livre, BI-Controle e do BI-LI incubados a 40°C em diferentes períodos de tempo foi investigada e comparada de acordo com a reação padrão de hidrólise do azeite de oliva a 37°C. Conforme mostrado na Figura 21, a estabilidade térmica da lipase imobilizada em aerogel modificado (BI-LI) foi maior que o controle e a enzima livre.

Nota-se que para a BI-Controle e a lipase livre verificou-se a inativação após seis dias de incubação a 40°C, enquanto o biocatalisador modificado permaneceu ativo por pelo menos 14 dias mantendo a atividade acima de 50% e aumentando após oito dias de incubação, ou seja, hiperativando no transcorrer do estudos de estabilidade, onde tal característica já foi relatado em outros biocatalisadores imobilizados em aerogel também no transcorrer da análise de estabilidade (MAURY *et al.*, 2005; ORÇAIRE *et al.*, 2006). Segundo estes autores o fenômeno é possível devido a dessorção de estabilizantes e proteínas menores presentes na solução de enzimática (LBC ou Lypozyme) encapsuladas em gel durante os testes sucessivos. O fenômeno de dessorção é considerado análogo a uma diálise direta das soluções enzimáticas hiperativando as enzimas no interior dos poros do gel. Portanto, o fenômeno observado neste estudo pode ser explicado a partir de uma possível purificação do biocatalisador remanescente por longos períodos de incubação em solução tampão fosfato de sódio (0,1M) promovendo a dessorção de impurezas na solução de enzimática (LBC) a partir da variação do tempo na avaliação da estabilidade térmica.

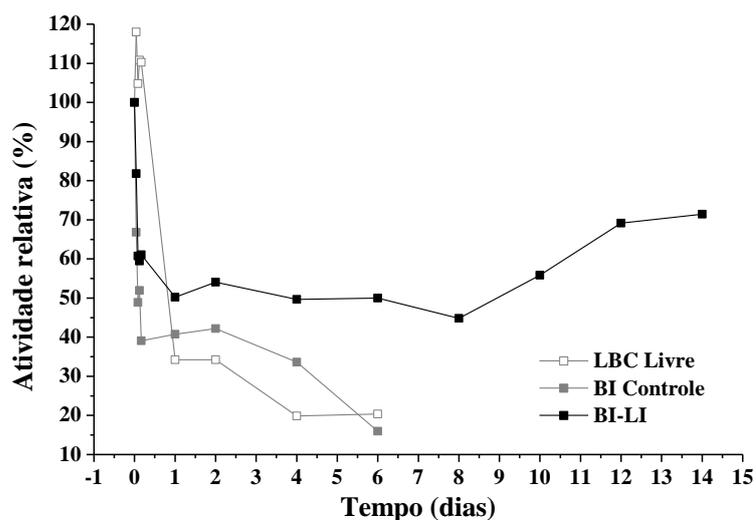


Figura 21. Estabilidade térmica de LBC livre e imobilizado em aerogel com (BI-LI) e sem modificação (BI-Controle) a 40 °C em diferentes tempos de incubação.

Sugere-se também a influência do mecanismo de adsorção interfacial entre o suporte e a enzima, permitindo que o Aerogel-LI simule a hidrofobicidade do substrato, e uma vez exposta em meio aquoso de baixa força iônica, as proteínas solúveis em água não permanecem significativamente imobilizadas enquanto que as lipases são fortemente adsorvidas e estabilizadas em sua forma aberta devido as características específicas da LBC, por exemplo os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Ser, His e Asp) e por uma região

hidrofóbica que circunda o sítio ativo com a tampa aberta (BASTIDA *et al.*, 1998; SÁNCHEZ *et al.*, 2017 e BELOZERSKY, 2018). Uma vez incubada por um longo período de tempo, o biocatalisador purificado fica com seu sítio ativo mais exposto fazendo com que haja aumento da atividade recuperada.

Na maioria dos resultados na literatura não apresentam hiperativação, conforme descrito por vários estudos. MA *et al.*, (2016) preparou uma sílica epoxy funcionalizada (F-560-S) através da modificação do sol da sílica com KH560 na presença do copolímero de tribloco F127, após remoção seletiva do copolímero pela temperatura apropriada, foram preparadas partículas de sílica com grandes áreas superficiais e volumes de poros e então, foi utilizada como suporte na imobilização da lipase *Candida Antarctica B* (LCALB) por ligação covalente. A LCALB livre e imobilizada em F-560-S foram incubadas por apenas 12h á 40°C, demonstrando que LCALB livre converteu menos de 5% e a lipase imobilizada obteve uma conversão abaixo de 40% na síntese de acetato de 1-feniletila através da reação de transesterificação de 1-feniletanol e acetato de vinila.

MIRANDA *et al.*, (2014) imobilizou a lipase *Thermomyces lanuginosus* (LTL) por adsorção física em partículas mesoporosas de poli-hidroxi-butilato (PHB), onde foi verificado que a lipase imobilizada desnaturou antes de 1h de incubação em meio aquoso à 40°C. Valores altos para a estabilidade térmica da LBC também foi reportado por LIU *et al.* (2011), que por sua vez imobilizou a LBC em matrizes hidrofóbicas reteve quase 100% de atividade original abaixo de 60°C e manteve 80% da atividade original a 65°C por 60min. Em contraste, a atividade catalítica de LBC livre caiu rapidamente para quase 40% de sua atividade original após incubação a 60°C por 60min. Como a imobilização da LBC foi realizada por adsorção física, o motivo vinculado a essa alta estabilidade térmica foi que provavelmente a imobilização forneceu uma espinha dorsal externa rígida para as moléculas da lipase.

A partir dos resultados expostos conclui-se que a modificação do aerogel com líquido iônico é uma alternativa bastante promissora para a estabilização da LBC, tornando-a termo estável e ativo por longos períodos de incubação acima de 336h. Porém ainda se faz necessário a análise dos parâmetros cinéticos dos biocatalisadores imobilizados (tópico 5.2.3), a fim de avaliar se teve melhoria ou não na afinidade da lipase com o substrato, assim como descrever a possibilidade de variação na velocidade reacional devido ao uso do aerogel modificado com líquido iônico como suporte na imobilização da LBC.

5.2.3. Determinação Parâmetros cinéticos na hidrólise do azeite de oliva

A fim de complementar a caracterização bioquímica dos biocatalisadores, neste tópico avaliou-se os parâmetros cinéticos utilizando o programa Origin® 8 foi possível calcular a constante de afinidade (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}). O ajuste do modelo cinético (Michaelis-Menten) aos pontos experimentais forneceu os valores dos parâmetros mostrados na Tabela 8, e são demonstradas graficamente na Figura 22.

Pode-se notar que as constantes cinéticas obtidas para o BI-Controle ($V_{max}= 681,24$ U/g e $K_m= 296,43$ mM) são inferiores para a V_{max} e superiores para o K_m quando comparados aos do BI-LI ($V_{max}= 891,87$ U/g e $K_m= 214,26$ mM). A partir desses dados conclui-se que o BI-LI tem uma maior velocidade reacional e uma maior afinidade com o substrato, devido ao menor valor de K_m . Desta maneira, observa-se que a modificação com líquido iônico fez com que o biocatalisador aumentasse em cerca de 23,62% a sua atividade.

De acordo com BADGUJAR *et al.* (2017) esse acréscimo pode ser atribuído a ativação interfacial da lipase retida no suporte mantendo o sitio ativo mais exposto ao substrato. Também pode ser verificado que para o BI-LI, teve uma maior afinidade com o substrato evidenciando ainda mais a possibilidade de uma ativação interfacial.

Essa exposição do sitio ativo foi observada nos estudos de estabilidade térmica no item 5.2.2. em que após longos períodos de incubação a lipase demonstrou hiperativação, sugerindo-se uma melhor conformação da LBC. A hiperatividade também foi observada na imobilização de carregamentos com baixa concentração de LBC (item 5.1) em Aerogel-LI, onde pode ser observado no carregamento de $100 \text{ U/g}_{\text{suporte}}$ uma atividade recuperada na faixa de 120%.

Na otimização do processo de imobilização por adsorção física da LBC em Aerogel-LI procede descrevendo o modelo matemático de Sips, ou seja, em baixas concentrações a distribuição de lipase tende a ser aleatória (modelo de Freundlich), que não é favorável para a disposição do sitio ativo da enzima, mas mesmo assim teve uma atividade recuperada superior a 100%, sugerindo uma maior afinidade com o suporte confirmado pela variação da constante de afinidade (de 296,43 para 214,26mM). Enquanto que o Aerogel-Controle adsorve a LBC seguindo o modelo de Redlich-Perterson, onde em altas concentrações descreve um perfil de distribuição aleatória de lipase, sugerindo uma possibilidade de conformação do sitio ativo indesejada podendo-se observar que o valor de K_m é maior para o BI-Controle.

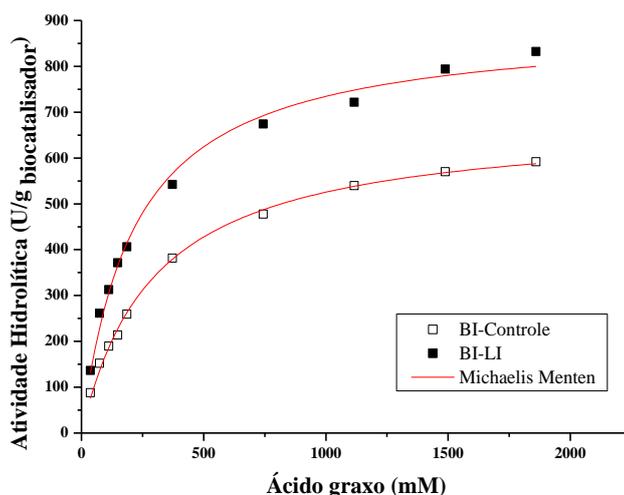


Figura 22. Atividade hidrolítica da LBC imobilizada em aerogel (BI-Controle) e em aerogel-LI (BI-LI) em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/água (37°C, pH 7,0).

Tabela 8. Parâmetros cinéticos da LBC imobilizada em aerogel e em Aerogel-LI.

Equação	$V = \frac{V_{max} * [\text{ácido graxo}]}{K_M + [\text{ácido graxo}]}$	
Suporte	BI-Controle	BI-LI
K_m (mM)	296,43	214,26
V_{max} (U/g)	681,24	891,87
R^2	0,99	0,99

Após a determinação das condições do protocolo de imobilização a partir de modelos matemáticos e realização de caracterização bioquímica, de acordo com exposto, a hiperativação da lipase imobilizada em Aerogel-LI se torna evidente em todos os testes realizados, tornando-o uma excelente alternativa para aplicação em síntese orgânica, como a síntese de ésteres etílicos (indústria de biocombustíveis) e a de palmitato de cetila (indústria de cosméticos).

5.3. Reações de síntese de Ésteres etílicos

O uso de matérias-primas de baixo valor e/ou brutos para síntese de biodiesel é um objetivo de inovação entre os parceiros produtores de biodiesel. Além de resíduos de óleos de cozinha ou gorduras animais, o mercado de biodiesel também pode utilizar óleos não

refinados a fim de evitar altas concentrações de ácidos graxos livres, comumente encontrados em óleos reusados, que podem causar a saponificação da reação, fazendo-se necessário o uso de uma maior quantidade de catalisador encarecendo o processo (CESARINI *et al.*, 2013).

Portanto, como BI-LI mostrou-se nos testes preliminares um biocatalisador estável e eficiente, ele foi aplicado na reação de transesterificação do óleo de coco bruto e etanol visando potencial produção de ésteres etílicos. O BI-Controle também foi aplicado às mesmas condições reacionais visando avaliar a modificação do líquido iônico nesse tipo de síntese.

Na Figura 23 é demonstrado bateladas de transesterificação do óleo de coco bruto com etanol em tempos reacionais entre 12-144h aplicando os biocatalisadores com carregamentos utilizados por BARBOSA *et al.*, (2016) de 300 mg/g_{suporte} tanto para o Aerogel-Controle como para o Aerogel-LI (BI-Controle e BI-LI), e do carregamento otimizado utilizando os modelos matemáticos de adsorção no item 5.1, onde foram obtidos valores de carregamento de aproximadamente 340mg/g_{suporte} na imobilização da LBC utilizando o Aerogel-LI (BI-LI-OTM).

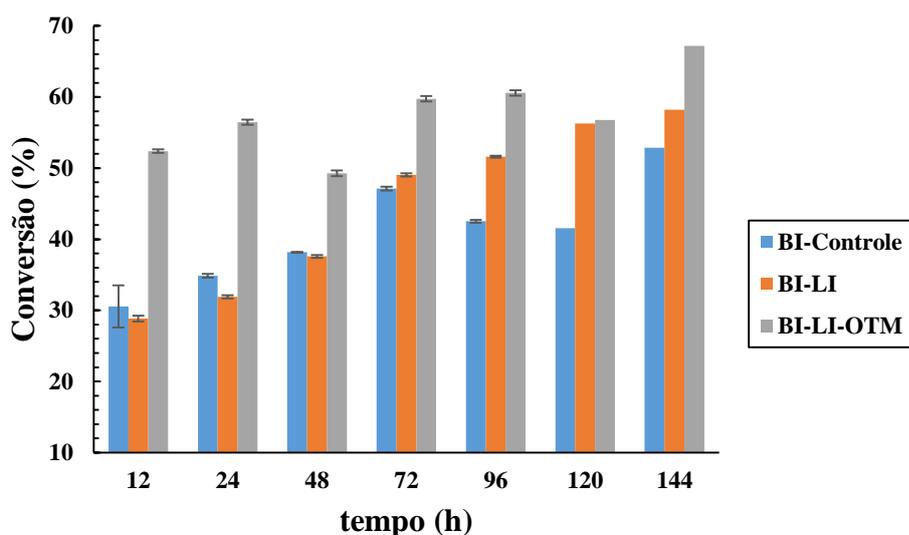


Figura 23. Efeito do tempo reacional na transesterificação do óleo de coco e álcool etílico na razão molar (1:7) a 40°C com 20% m/m de biocatalisador (BI-Controle; BI-LI; BI-LI-OTM).

De forma geral, a partir das conversões obtidas na reação de transesterificação utilizando os três tipos de biocatalisadores pode-se observar a influência positiva do uso do LI na modificação da sílica para o processo de imobilização (BI-LI), assim como o estudo de saturação do suporte (BI-LI-OTM) cujo os valores diferem do BI-Controle.

É importante ressaltar que a variação de carregamento otimizado (297mg/g_{suporte}) e o proposto por BARBOSA *et al.*, (2016) (300mg/g_{suporte}) é desprezível, e por esse motivo não

foi realizada uma curva BI-Controle-OTM. Inicialmente, pode-se observar, que a curva cinética do BI-LI-OTM retém uma melhor capacidade de conversão para todos os tempos reacionais, devido a sua maior retenção de LBC e de sua afinidade com o suporte tornando o sítio ativo mais exposto ao meio orgânico, entrando em convergência com os dados expostos no processo de otimização da técnica de imobilização por adsorção física (item 5.1) e na caracterização bioquímica desses biocatalisadores (item 5.2).

Pode-se observar também, que para os tempos de 12 até 72h o BI-Controle teve um comportamento similar ao BI-LI na conversão de ésteres etílicos, isso se deve provavelmente ao tamanho dos poros e ao comportamento da LBC em relação ao Aerogel-LI. De acordo com o explanado no item 5.1.2, o processo de adsorção que melhor representa a distribuição da LBC no Aerogel-LI é o modelo isotérmico de Sips, onde em baixas concentrações de lipase, a tendência é de uma distribuição mais aleatória em sua superfície, comportamento similar ao proposto por Freundlich.

Deste modo, como o BI-LI foi preparado com um carregamento abaixo do proposto para sua saturação, leva-se a crer que a LBC está distribuída no Aerogel-LI com tendência a aleatoriedade de Freundlich. Isso somado com a possíveis problemas difusionais atrelados à maior tamanho de poro e área superficial do Aerogel-LI, faz com que leve mais tempo para que o substrato entre em contato com o sítio ativo da LBC, que além de estar disposta em um suporte de maior área, está distribuída em sua superfície de maneira aleatória. Uma vez transposta a barreira difusional e de distribuição molecular, obteve-se uma conversão muito superior nos tempos de 96, 120 e 144h para o BI-LI.

No tempo de 120h inclusive, a conversão do BI-LI chega a equiparar a do BI-LI-OTM, porém com o transcorrer do tempo, a conversão aumentou significativamente para o BI-LI-OTM, devido provavelmente a uma melhor acomodação do sítio ativo da enzima. Cromatogramas referente ao óleo de coco bruto e para mistura de ésteres etílicos adquirida na transesterificação do óleo de coco bruto e álcool etílico utilizando o BI-LI-OTM após 144h de batelada está disponível no ANEXO 1. Foi realizada uma prospecção acadêmica em ordem cronológica da produção de biodiesel por via enzimática utilizando óleo de coco (Tabela 9) e conclui-se que até o presente momento, não existe dado publicado para a aplicação utilizando óleo de coco bruto. Logo, os dados de conversão exibidos na Figura 23 serão comparados aos processos que utilizam óleo de coco refinado.

Nota-se que a maioria dos estudos utilizaram uma metodologia de superfície de resposta para otimização de seus resultados, abrindo possibilidades para a melhoria dos

resultados ilustrados na Figura 23. TUPUFIA *et al.*, (2013) e WOO *et al.*, (2016) utilizaram ultrassom para amplificar os resultados de conversão de ésteres etílicos, onde na reação em batelada (convencional), atingiu uma conversão próxima de 80% enquanto que em meio reacional utilizando Ultrassom, foi necessária apenas 3h para atingir 92% de conversão.

Vale salientar que o método de imobilização realizado no presente trabalho, a adsorção física, é uma alternativa aos demais métodos apresentados na Tabela 9, pela fácil aplicabilidade e rápida obtenção do derivado imobilizado. Além disso, o líquido iônico utilizado para a modificação do aerogel pode ser recuperado no extrato gerado na secagem do método utilizado, o supercrítico, conhecido por se tratar de um método de extração bastante eficiente.

Pode-se observar que o estudo LBC imobilizada e aplicada à síntese de ésteres etílicos utilizando óleo de coco como matéria prima não foi abordada por nenhum dos autores listados na Tabela 9. No entanto OLIVEIRA *et al.*, (2014) aplicou a LBC imobilizou e matriz sol-gel modificada com líquido iônico na transesterificação do óleo de babasu (óleo vegetal não comestível) e etanol obtendo uma conversão ótima de ésteres etílicos de 51,9% por meio do planejamento experimental com razão molar (óleo:álcool) de 1:7 e temperatura de 40°C em 48h de reação. Essas condições são similares ao exposto na Figura 23, onde foi obtido para esse tempo reacional por volta de 50% de conversão. No entanto, demonstra-se que o efeito do tempo reacional é crucial para o aumento dessa conversão. OLIVEIRA *et al.*, (2014) também observou que com a sobrecarga realizada por adsorção física do biocatalisador previamente imobilizado por encapsulação, foi possível aumentar a conversão de ésteres etílicos de 51,9% para 98,69%.

Resultados favoráveis para a aplicação da LBC imobilizada para obtenção de ésteres etílicos também é observada por ABDULLA *et al.* (2013), onde a LBC imobilizada por aprisionamento em uma matrix híbrida de Alginato & k-carrageenan foi aplicada a reação de transesterificação do óleo de pinhão manso cru (*Jatropha curcas* L.) e etanol à 35°C na razão molar óleo:álcool de 1:10 por 24 h, obtendo 100% de conversão. Deste modo, conclui-se que estudo de isotermas de adsorção realizado no item 5.1. impactou na melhoria do desempenho do biocatalisador na síntese orgânica, podendo ser aplicada na síntese de outros tipos de ésteres de interesse industrial com mecanismo reacional mais simples, no próximo item será abordado a esterificação do ácido palmítico com o álcool cetílico para obtenção de palmitato de cetila, éster importante na indústria de cosméticos e farmacêutica.

Tabela 9. Prospecção acadêmica em ordem cronológica da produção de biodiesel por via enzimática utilizando óleo de coco

Fonte de lipase	Método de imobilização	Suporte	Condições reacionais	Conversão máxima	Autor
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Lipozyme TL IM (Novozymes, Bagsværd, Denmark)	Imobilizado em um gel de sílica não compressível	Razão molar óleo de coco para álcool fúsel: 1:3; Oferecimento de biocatalisador: 15% (m/m); tempo: 20h; Temperatura: 23°C Agitação: 130 rpm	Efetivamente convertidos em ésteres de sabor	SUN <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida antarctica</i> expressada em <i>Aspergillus niger</i>	Novozym 435	Resina acrílica macroporosa	Razão molar óleo de coco para etanol: 1:10; Oferecimento de biocatalisador: 7% (m/m); tempo: 24h; Temperatura: 60°C Agitação: 200 rpm	80,50%	RIBEIRO <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida antarctica</i> expressada em <i>Aspergillus niger</i>	Novozym 435	Resina acrílica macroporosa	Razão molar óleo de coco para etanol: 1:3; Oferecimento de biocatalisador: 1% (m/m); tempo: 50h (convencional); 3h (Ultrassom 43 kHz) Temperatura: 50°C Agitação: 350 rpm	Convencional (80%); Ultrassom 43kHz (92%)	TUPUFIA <i>et al.</i> (2013)
<i>Candida antarctica</i> expressada em <i>Aspergillus niger</i>	Novozym 435	Resina acrílica macroporosa	Razão molar óleo de coco para etanol: 1:9 Oferecimento de biocatalisador: (m/m); 20% tempo: 0,5h (Ultrassom em potência máxima) Temperatura: 65°C Agitação: não mencionado	Cerca de 70%	MICHELIN <i>et al.</i> , (2015)
<i>Candida antarctica</i> expressada em <i>Aspergillus niger</i>	Novozym 435	Resina acrílica macroporosa	Tupufia <i>et al.</i> , 2013, com modificações, onde: Razão molar óleo de coco para etanol: 5:1; tempo: 0,5h (Ultrassom 43 kHz) OBS*: o objetivo da pesquisa foi misturar o biodiesel derivado com diesel de petróleo e avaliar o potencial do biocombustível	Cerca de 100%	WOO <i>et al.</i> , (2016)

Continuação da Tabela 9.

Fonte de lipase	Método de imobilização	Suporte	Condições reacionais	Conversão máxima	Autor
<i>Cercospora kikuchii</i>	Ligação covalente	Casca de arroz	Razão molar óleo de coco:etanol 1:12 Oferecimento de biocatalisador: 20% (m/m) tempo: 72 h Temperatura: 50°C Agitação contínua de 150 rpm	97,1%	COSTA-SILVA <i>et al.</i> , (2016)
<i>Candida antarctica</i> expressada em <i>Aspergillus niger</i>	Novozyme 435	Resina acrílica macroporosa	Razão molar óleo de coco para Butanol: 1:6.2 Oferecimento de biocatalisador: 5,8% (m/m); tempo: 4h Temperatura: 65°C Agitação: 450 rpm	Baixa massa molecular butil éster (74%) elevada massa molecular butil ester (24%)	BOUAID <i>et al.</i> , (2017)
<i>Cercospora kikuchii</i>	Ligação cruzada usando glutaraldeído como agente	Micropartícula de acetato de quitosana	Razão molar óleo de coco:etanol 1:12; Oferecimento de biocatalisador: 20% (m/m) tempo: 120h; Temperatura: 40°C; Agitação contínua de 150 rpm.	97,90%	COSTA-SILVA <i>et al.</i> , (2017)
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Aprisionamento	Alginato de cálcio	Razão mássica óleo de coco:metanol: 300:60 Oferecimento de biocatalisador: 7,2% (m/m) tempo: 6h Temperatura: 35°C por 5h30min e 60°C por 30min Agitação contínua de 150 rpm.	85,5%	VENKATESAGO WDA <i>et al.</i> , (2017)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção física	Aerogel-LI	Razão mássica óleo de coco bruto:etanol:1:7 Oferecimento de biocatalisador: 20% (m/m) tempo: 144h Agitação contínua de 200 rpm	70%	Este trabalho

5.4. Reações de síntese de palmitato de cetila

A fim de avaliar o potencial do BI-LI-OTM e BI-Controle, carregamentos que já demonstraram ser promissores na síntese orgânica no item anterior em outro tipo de síntese (transesterificação para obtenção de ésteres etílicos), o palmitato de cetila foi selecionado por ser possível sintetizar através de uma esterificação direta, onde a contabilização do percentual de conversão é realizada de maneira simplificada (titulação ácido/base), de acordo como descrito no item 4.2.6. ampliando as suas possibilidades de estudo. Outro motivo relevante para escolha desse éster, é que se trata de um éster de elevado valor agregado com poucas publicações referente a sua síntese e otimização por esterificação (GUNCHEVA *et al.*, 2011, SERRANO-ARNALDOS *et al.*, 2016 e MUTLU e YILMAZ, 2016)

Primeiramente, para termos uma base de estudo, foram fixadas como variáveis a temperatura reacional (°C) (T), a razão molar (mol de ácido: mol de álcool) (RM) e o percentual de biocatalisador oferecido no meio reacional (%m/m) (PB) por serem variáveis já amplamente aplicadas em estudos de otimização experimental quando se trata síntese de ésteres. SILVA *et al.*, (2014), imobilizou a lipase *pancreática porcina* em poli-hidroxi-butilato por adsorção física e aplicou o derivado imobilizado na síntese do sabor do abacaxi por esterificação do butanol e ácido butírico utilizando heptano como meio de dispersão dos reagentes, onde, através da variação dos fatores T, PB e percentual de peneira molecular obteve uma conversão ótima de 93% após 2h de reação. Enquanto que LOPES *et al.*, (2011) produziu a lipase *Rhizopus* sp. por fermentação em estado sólido e aplicou na síntese de oleato de oleína, a lipase Lipozyme TL IM também foi utilizada como biocatalisador para efeito comparativo por se tratar de uma lipase imobilizada comercializada pela empresa Novozymes amplamente aplicada em síntese orgânica. Após a variação dos parâmetros RM e PB, rendimentos ótimos de conversão foram obtidos para a lipase livre (93,1%) e comercial (94,2%).

Tratando-se da seleção do ponto central, prosseguiu a escolha utilizando os seguintes critérios:

- A temperatura escolhida foi 50°C devido ao ponto de fusão do palmitato de cetila, que se encontra na faixa de 43-57°C (MERCKMILLIPORE, 2017) e por já ter sido demonstrada como temperatura ótima de atuação da LBC livre (Item 5.2.1) em meio aquoso.

- Para facilitar a dispersão dos reagentes, foi utilizado hexano, por se tratar de um solvente que já vem sendo amplamente empregado em etapas anteriores no processo de imobilização da LBC no Aerogel-Controle e Aerogel-LI (Item 4.2.2).
- A razão molar (mol de ácido: mol de álcool) foi de (1:1) por se tratar de uma reação direta e por ser abordado na literatura para síntese de palmitato de cetila (GUNCHEVA *et al.*, 2011; MUTLU e YILMAZ, 2016; SERRANO-ARNALDOS *et al.*, 2016);
- O percentual de biocatalisador oferecido no meio reacional foi de 10 (% m/m), ponto considerado médio quando se trata da aplicação da lipase imobilizada em síntese orgânica;

Variáveis como agitação e tempo reacional foram fixadas, onde a agitação foi mantida a mesma da qual foi utilizada em todo estudo de otimização do carregamento de lipase (item 5.1) e caracterização bioquímica (item 5.2), para assim podermos estabelecer um parâmetro comparativo com menor erro. Para fixar o tempo reacional, um experimento piloto foi realizado com o ponto central proposto visando vislumbrar uma conversão a ser otimizada.

Como demonstrado na Figura 24, tempos reacionais inferiores a 3h foram ineficientes para a conversão de palmitato de cetila, no decorrer do teste piloto decidiu-se permitir que a reação procedesse no decorrer do período noturno para só depois ser realizado a aferição da conversão. Deste modo, foram realizados testes no tempo reacional de 15 e 18h, sendo fixado o tempo de 18h por apresentar maior conversão.

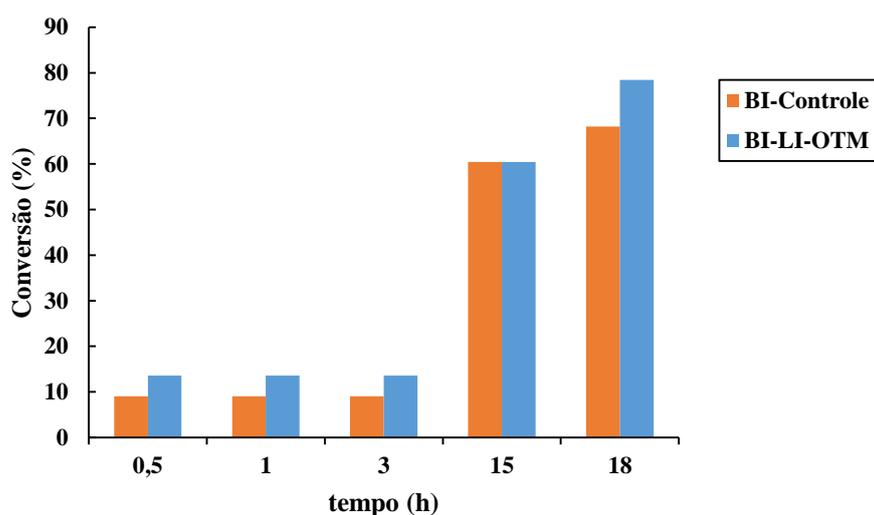


Figura 24. Triagem para seleção de tempo reacional no estudo da biossíntese de palmitato de cetila utilizando o BI-Controle e BI-LI-OTM.

Com base nos parâmetros preestabelecidos, o planejamento experimental visando a otimização do processo de produção de palmitato de cetila por via enzimática, foi realizado de acordo como demonstrado pela Tabela 10. Através do estabelecendo de um comparativo entre os pontos centrais e os demais pontos, podemos perceber que com os fatores foram necessários para que o seu aumento (de 1 para +1,68) impactasse positivamente na conversão, foram a concentração de álcool e o percentual de biocatalisador oferecido ao sistema reacional (Ensaio 14 e 12). Enquanto que quando compararmos o ponto central com o ensaio 10, percebe-se que o aumento da temperatura é prejudicial para a eficiência da síntese de palmitato de cetila.

Tabela 10. Experimentos de Síntese de pamiato de cetila pelo biocatalisador controle e pelo biocatalisador modificado com líquido iônico

Ensaio	Variáveis Independentes			Variável dependente	
	T (°C)	RM (Ácido:Álcool)	PB (%m/m)	Éster Convertido (%) (Y) BI-Controle	BI-LI-OTM
1	41 (-1)	1:0,7 (-1)	5,2 (-1)	24,4	14,4
2	59 (+1)	1:0,7 (-1)	5,2 (-1)	20,0	2,5
3	41 (-1)	1:1,3 (+1)	5,2 (-1)	50,0	65,0
4	59 (+1)	1:1,3 (+1)	5,2 (-1)	25,0	5,0
5	41 (-1)	1:0,7 (-1)	14,8 (+1)	56,0	64,0
6	59 (+1)	1:0,7 (-1)	14,8 (+1)	49,5	39,6
7	41 (-1)	1:1,3 (+1)	14,8 (+1)	58,8	90,0
8	59 (+1)	1:1,3 (+1)	14,8 (+1)	64,4	44,8
9	35 (-1,68)	1:1 (0)	10 (0)	71,43	76,09
10	65 (+1,68)	1:1 (0)	10 (0)	33,33	8,70
11	50 (0)	1:0,5 (-1,68)	10 (0)	28,57	31,58
12	50 (0)	1:1,5 (+1,68)	10 (0)	78,95	86,67
13	50 (0)	1:1 (0)	2 (-1,68)	2,27	0,00
14	50 (0)	1:1 (0)	18 (+1,68)	82,95	86,36
15	50 (0)	1:1 (0)	10 (0)	73,86	82,95
16	50 (0)	1:1 (0)	10 (0)	70,45	81,82
17	50 (0)	1:1 (0)	10 (0)	69,32	81,82
18	50 (0)	1:1 (0)	10 (0)	68,18	81,82
19	50 (0)	1:1 (0)	10 (0)	68,18	80,68
20	50 (0)	1:1 (0)	10 (0)	68,18	79,55

T= Temperatura; RM= Razão Molar; PB= Percentual de biocatalisador

É nítido observar que o ensaio com a melhor conversão é o 7 utilizando o BI-LI-OTM, onde a reação ocorreu á 41°C, em RM de 1:1,3 e 14,8%*m/m* de PB neste ponto há um balanço das qualidades e defeitos dos fatores envolvidos de tal maneira, que fez com que a conversão atingisse quase a sua totalidade. No que concerne ao BI-Controle, a maior conversão foi atingida foi de 82% nas condições do ensaio 14, no qual foi oferecido o maior percentual de biocatalisador no sistema reacional (18%). Enquanto que para o BI-LIOTM foi de 14,8% nas condições do ensaio 7. Tal diferença pode ser explicada da seguinte maneira, o BI-LI-OTM tem as maiores conversões em quase todos os ensaios (Ensaio 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20) por apresentar uma maior retenção de lipase na superfície do seu suporte, fazendo que não seja necessário um maior carregamento de biocatalisador imobilizado para a obtenção de uma boa conversão. Afim de suprir esta limitação para BI-Controle, se fez necessário um maior percentual de biocatalisador (18%) para atingir maiores conversões (82%).

Também é possível observar que o aumento da concentração de álcool no substrato foi mais benéfico para o BI-LI-OTM. Essa variação de comportamento na variável RM é devido provavelmente a maior exposição do sítio ativo da lipase à interface hidrofóbica, de acordo com o explanado nos itens 5.1 e 5.2., mostrando evidências de ativação interfacial, fazendo com que biocatalisador fique mais sensível a modificação na variação de seu substrato, uma vez que a LBC se encontra distribuída no Aerogel-LI com tendência a homogeneidade, comportamento descrito pelo modelo matemático de Sips.

Comportamento similar é demonstrado por KUO et al., 2012, onde aplicando as lipases Lipozyme RMIM e Novozym 435 na esterificação do ácido octanóico e álcool cetílico, obtiveram uma conversão de octanoato de cetila de 94% e 97%, respectivamente. O parâmetro RM influenciou positivamente quando empregado um excesso de álcool no meio reacional, descrevendo a existência de uma inibição competitiva da enzima por ácido octanóico. A forte acidificação do microambiente da lipase pode levar a mudanças conformacionais na sua estrutura tridimensional diminuindo a sua eficiência.

A interação entre RM e PB também apresentou efeito positivo, indicando que a redução da conversão causada pela produção de água pode ser reduzida se a quantidade de etanol aumentar proporcionalmente em relação à quantidade de enzima. O álcool por sua vez, quando se encontra em maior quantidade, obtém maior vantagem pelo sitio ativo da enzima em reação ao éster recém-formado e ao ácido palmítico, por se tratar de uma molécula menor e mais concentrada, favorecendo a reação direta e uma maior taxa de conversão.

O mecanismo reacional de palmitato de cetila por esterificação é exposto na Figura 11 no item 3.1.3. Através da análise do comportamento da lipase na cinética de esterificação, MAURY *et al.*, (2005) reporta que para a LBC encapsulada em aerogel aplicada na reação do ácido láurico e 1-octanol apresenta comportamento de uma cinética Ping-Pong Bi-Bi com inibição de ambos os substratos. Isso explica o motivo pelo qual em maiores concentrações de álcool cetílico (Ensaio 12) não foi obtido ainda maiores conversões de palmitato de cetila.

E finalmente, referindo-se a relevância da modificação da temperatura, no ensaio 10 nós temos o experimento que performa na maior temperatura abordada. Percebe-se que o aumento da temperatura é prejudicial para ambos os biocatalisadores, dado que entra em convergência com a natureza do biocatalisador, que tende a degenerar em altas temperaturas.

Para ter uma informação mais acurada, o estudo estatístico ANOVA foi realizado, assim como o estudo de superfície de resposta para ambos os biocatalisadores aqui testados. Nas tabelas 11 a 14 são apresentadas as análises estatísticas e as ANOVAs obtidas para cada biocatalisador.

Na tabela 11 é confirmado estatisticamente que as variáveis T, RM e PB, foram significativas para a conversão de palmitato de cetila utilizando o BI-Controle, porém as suas interações, não foram significativas o suficiente. Isso é observado experimentalmente no ensaio 14, que teve a maior conversão para o BI-Controle. Neste ensaio a variável mais significativa para uma boa conversão foi o PB, onde aqui parece com o menor p-valor reportado e maior coeficiente de regressão.

Tabela 11. Análise Estatística para a Síntese de Palmitato de cetila pelo BI-Controle

Fatores	Coef. Regr.	Erro padrão	t(10)	p	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média*	69,86	4,16	16,80	0,00	60,59	79,12
T (°C) (L) *	-6,91	2,76	-2,50	0,03	-13,06	-0,76
T (°C) (Q) *	-7,15	2,69	-2,66	0,02	-13,15	-1,16
RM (Ácido: Álcool) (L)*	9,74	2,76	3,53	0,01	3,59	15,89
RM (Ácido: Álcool) (Q)*	-6,66	2,69	-2,48	0,03	-12,66	-0,67
PB (%m/m) (L)*	17,95	2,76	6,50	0,00	11,80	24,10
PB (%m/m) (Q)*	-10,61	2,69	-3,94	0,00	-16,61	-4,62
T x RM	-1,07	3,61	-0,30	0,77	-9,11	6,96
T x B	3,56	3,61	0,99	0,35	-4,48	11,59
RM x B	-1,62	3,61	-0,45	0,66	-9,65	6,42

T= Temperatura; RM= Razão Molar; PB= Percentual de biocatalisador; L=Linear; Q= Quadrático

*Significância de 95%.

T_{tab}=2,23

Já nos resultados expostos na Tabela 12, temos que para o BI-LI-OTM novamente temos que todos os fatores lineares e quadráticos são significantes para o estudo, porém, a interação entre eles também é. Aqui temos que T x RM, por apresentarem p-valores acima do nível α de significância utilizado (0,05) também é significativo, resultado convergente com o demonstrado experimentalmente na Tabela 10, onde a melhoria da conversão de palmitato de cetila deu-se principalmente no equilíbrio entre as variáveis tendo T e RM um maior impacto devido à natureza do biocatalisador de sensibilidade a temperaturas elevadas e de possuir uma fragilidade em substratos ácidos.

Tabela 12. Análise Estatística para a Síntese de Palmitato de cetila pelo BI-LI-OTM

Fatores	Coef. Regr.	Erro padrão	t(10)	P	Lim. Conf. -95%	Lim. Conf. +95%
Média*	81,62	2,82	28,93	0,00	75,34	87,91
T (°C) (L) *	-18,67	1,87	-9,97	0,00	-22,84	-14,50
T (°C) (Q) *	-15,00	1,83	-8,22	0,00	-19,06	-10,93
RM (Ácido: Álcool) (L)*	12,96	1,87	6,92	0,00	8,79	17,13
RM (Ácido: Álcool) (Q)*	-9,07	1,83	-4,97	0,00	-13,13	-5,00
PB (%m/m) (L)*	21,74	1,87	11,61	0,00	17,57	25,91
PB (%m/m) (Q)*	-14,72	1,83	-8,06	0,00	-18,78	-10,65
T x RM*	-8,61	2,45	-3,52	0,01	-14,06	-3,16
T x B	0,30	2,45	0,12	0,91	-5,15	5,75
RM x B	-2,74	2,45	-1,12	0,29	-8,19	2,70

T= Temperatura; RM= Razão Molar; PB= Percentual de biocatalisador; L=Linear; Q= Quadrático

*Significância de 95%. $T_{tab}=2,23$

Nos testes estatísticos das tabelas 11 e 12 de t-student [T(10)], as variáveis não-significativas possuem valores calculados dentro do intervalo $-t_{tab} < t(10) < t_{tab}$. Tal resultado é refletido nos resultados do coeficiente de regressão e de seu respectivo erro padrão, onde o valor do coeficiente é muito próximo do valor do erro, tornando a variável irrelevante para o estudo. Os resultados experimentais foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem e o método dos mínimos quadrados foi utilizado para a geração dos coeficientes de regressão para a média, linear e interação dos termos quadráticos.

O modelo matemático com as variáveis codificadas que representam a porcentagens de esterificação são demonstradas nas Equações 15 e 16

$$Y_{BI-Controle} = 69,9 - (6,9 * T) - (7,1 * T^2) + (9,7 * RM) - (6,7 * RM^2) + (17,9 * PB) - (10,6 * PB^2) \quad \text{Equação 15}$$

$$Y_{BI-LI-OTM} = 81,6 - (18,7 * T) - (15,0 * T^2) + (13,0 * RM) - (9,1 * RM^2) + (21,7 * PB) - (14,7 * PB^2) - (8,6 * T * RM) \quad \text{Equação 16}$$

Para validação do modelo matemático e testar a sua significância, foi realizado o estudo de análise de variância (ANOVA) assim, sendo exposta na Tabela 13 para a análise do delineamento experimental realizado utilizando o BI-Controle e a Tabela 14 para o delineamento experimental do BI-LI-OTM. Verifica-se primeiramente que o valor do F_{calc} se enquadrou na região de aceitação tanto para a análise do BI-Controle, como para a do BI-LI-OTM, pois $F_{calc} > F_{tab}$ para todas as variáveis estudadas.

Tabela 13. ANOVA para a Síntese de palmitato de cetila pelo BI-Controle

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	9008,80	9	1000,98	9,62
Resíduo	1040,02	10	104,00	
Falta de ajuste	1015,05	5	203,01	
Erro puro	24,97	5	4,99	
Total	10048,82	19		

$R^2 = 89,65\%$; $F_{9;10;0,05} = 3,02$

Pode ser observado que o modelo quadrático polinomial representa uma boa aproximação para todas as respostas investigadas devido aos estatisticamente significativos valores-p ($<0,05$) dos modelos, que foi confirmado por elevados coeficientes de determinação múltipla (R^2), 89,65% para o BI-Controle e 97,72% para o BI-LI-OTM.

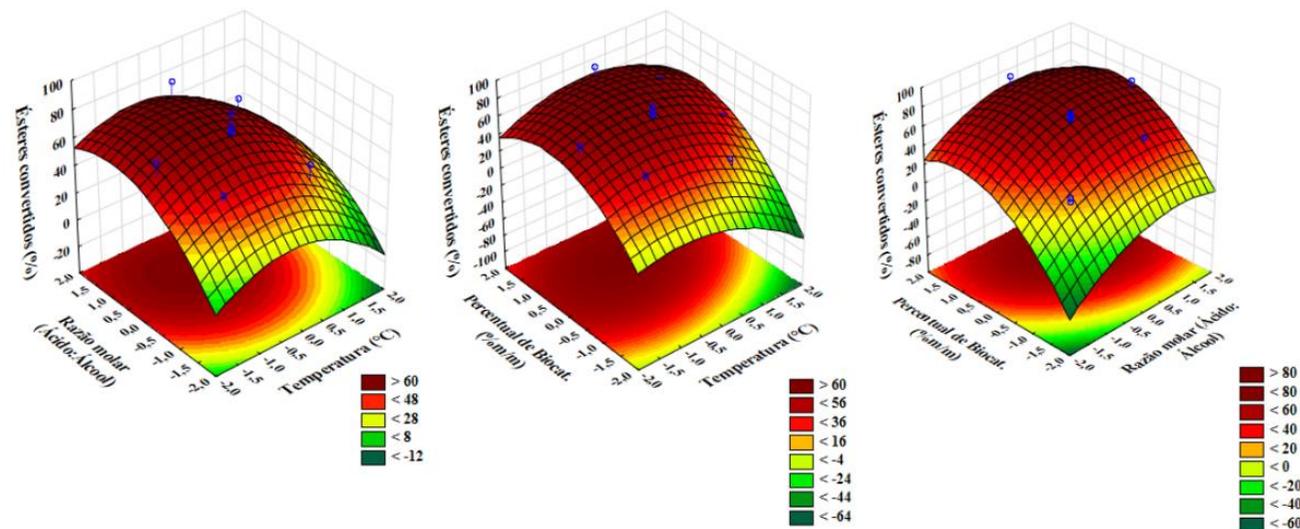
Tabela 14. ANOVA para a Síntese de palmitato de cetila pelo BI-LI-OTM

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	20523,61	9,00	2280,40	47,66
Resíduo	478,49	10,00	47,85	
Falta de ajuste	471,61	5,00	94,32	
Erro puro	6,89	5,00	1,38	
Total	21002,10	19,00		

$R^2 = 97,72\%$; $F_{9;10;0,05} = 3,02$

A partir o modelo matemático gerado pela análise estática, foi possível elaborar as respectivas superfícies de resposta para o BI-Controle e para o BI-LI-OTM, sendo demonstradas graficamente na Figura 25.

BI-Controle



BI-LI-OTM

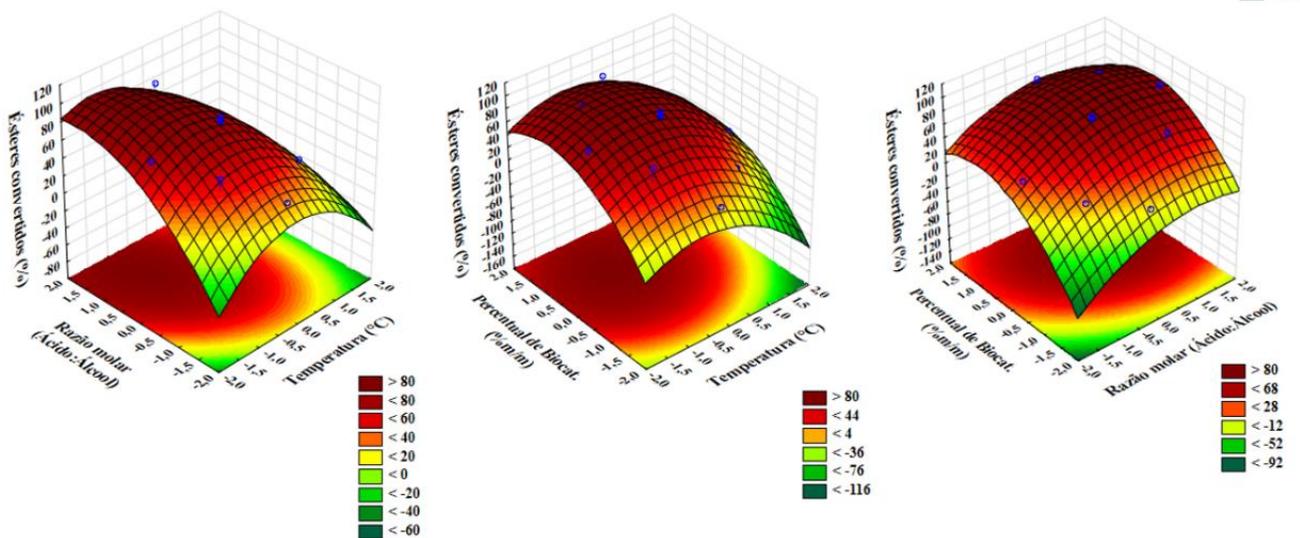


Figura 25. Superfícies de resposta para cada biocatalisador estudado.

Devido à grande significância das variáveis envolvida no estudo, três superfícies de resposta foram geradas para demonstrar e região ótima de trabalho estatisticamente. Pode-se notar que nas superfícies de resposta geradas, para o BI-Controle apenas um único gráfico apresenta uma região com conversão acima de 80%, enquanto que nas superfícies de resposta geradas pelo BI-LI-OTM, todos os gráficos apresentam essa região.

Podemos notar que o a modificação com líquido iônico de fato tornou a reação mais eficiente em termos de percentual de conversão e custos atrelados a performance do experimento, na Tabela 15 demostramos as regiões ótimas de trabalho de cada biocatalisador.

Tabela 15. Região ótima de trabalho para cada biocatalisador aplicado.

Ensaio	Variáveis Independentes			Variável dependente	
	T (°C)	RM (Ácido:Álcool)	PB (%m/m)	Éster Convertido (%) (Y)	
				BI-Controle	BI-LI-OTM
7	41 (-1)	1:1,3 (+1)	14,8 (+1)	58,8	90,0
14	50 (0)	1:1 (0)	18 (+1,68)	82,95	86,36

T= Temperatura; RM= Razão Molar; B= Percentual de biocatalisador

Deste modo, conclui-se que utilizando o biocatalisador modificado, se utiliza menos energia devido à redução de temperatura reacional de 50°C para 41°C, se consome menos biocatalisador imobilizado, onde em vez de utilizar 18%, utiliza-se 14,8%, e por fim, diminui a necessidade de ácido palmítico que é o reagente mais oneroso empregado na composição do substrato reacional, onde passa-se a trabalhar com um excesso de álcool cetílico, diminuindo em 12,7% a massa de ácido palmítico no sistema reacional.

Após realizado a otimização da produção de palmitato de cetila nas variáveis T, RM e PB, foi realizado o estudo do tempo reacional ótimo na região de melhor conversão de ésteres (90%, ensaio 7 utilizando o BI-LI-OTM). Na Figura 26 pode-se notar que com 15h foi mais que o suficiente para converter o palmitato de cetila de maneira mais eficiente em relativa totalidade (92%-100%).

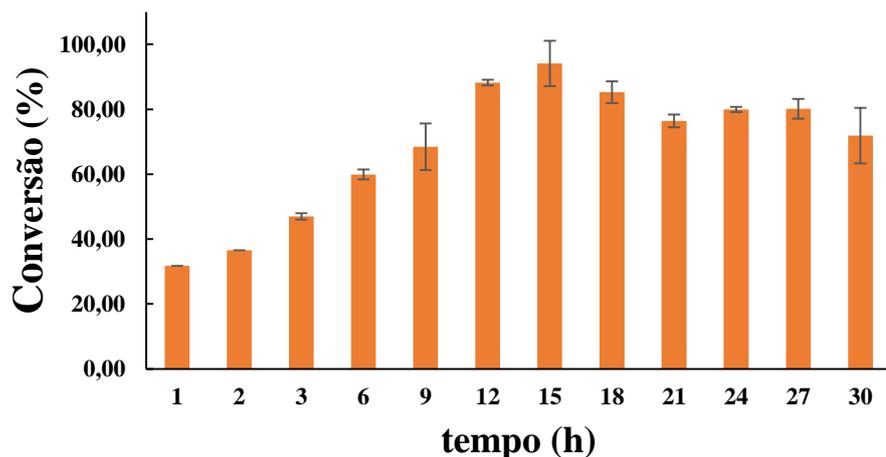


Figura 26. Estudo cinético da produção de palmitato de cetila utilizando o ponto de maior conversão (Ensaio 7, BI-LI-OTM).

Portanto, avalia-se que a variável tempo também é de fundamental avaliação quando se trata da conversão de ésteres por esterificação, uma vez que no estudo preliminar para avaliar o tempo reacional ótimo para prosseguir com o delineamento experimental, obteve-se que o tempo ótimo de 18h (Figura 24, página 63), enquanto que na Figura 26 demonstra que houve um decaimento no tempo reacional. Essa variação de tempo é devido a otimização do processo pois na Figura 24 o ensaio foi realizado no ponto central, ou seja à 50°C, RM (1:1)(ácido:álcool) e 10%*m/m* de PB enquanto que na Figura 26 foi realizado nas condições otimizadas de 41°C, RM (1:1,3)(ácido:álcool) e 14,8%*m/m* de PB, fazendo com que o BI-LI-OTM atue de maneira mais eficiente em menor quantidade de tempo devido a facilidade proporcionada pela otimização de contato do substrato com o sítio ativo da lipase premeditando possíveis inibições por coprodutos.

Na literatura existem poucos relatos sobre a síntese de palmitato de cetila, onde geralmente é realizado pela transesterificação de algum óleo com o álcool cetílico (PAPADAKI *et al.*, 2017; UNGCHAROENWIWAT *et al.*, 2016; UNGCHAROENWIWAT *et al.*, 2015) porém a mistura desses ésteres é de grande dificuldade, podendo tornar o processo oneroso a depender da aplicação. Dessa forma, apenas GUNCHEVA *et al.* (2011), MUTLU e YILMAZ, (2016) e SERRANO-ARNALDOS *et al.* (2016) utilizarão a catalise por esterificação direta para síntese de palmitato de cetila, resultados e região experimental de trabalho são reportados na Tabela 16. Observa-se que apesar do BI-LI-OTM possuir um longo tempo reacional quando comparado aos resultados reportados dos demais autores da Tabela 16, o palmitato de cetila sintetizado com o BI-LI-OTM é o que opera em uma menor

temperatura reacional, balanceando um pouco o gasto energético pelo uso de altas temperaturas. Outro fator relevante, é que a síntese por BI-LI-OTM ocorre utilizando um excesso de álcool. De acordo com orçamento realizado no dia 31/07/2017 pela empresa Metaquímica produtos LTDA (CNPJ 07.056.011/0001-32), o valor do ácido palmítico é em torno de R\$182,48/Kg, enquanto que o valor do álcool cetílico é em torno de R\$52,50/Kg.

Nota-se que quando analisamos os trabalhos de GUNCHEVA *et al.* (2011), MUTLU e YILMAZ (2016) e SERRANO-ARNALDOS *et al.*, (2016), observamos que todos os autores trabalharam com a razão molar de 1:1 (ácido:álcool), isso ocorreu pois todos os trabalhos utilizaram pontos centrais para a realização da pesquisa, nenhum dos autores realizaram a metodologia de delineamento experimental fatorial, optaram por estudar os parâmetros separadamente. E, como foi discutido na análise estática para o BI-LI-OTM, no ensaio de melhor conversão (Ensaio 7) a interação dos fatores T e RM é bastante relevante para a melhoria da conversão.

Tabela 16. Demonstrativo das condições reacionais ótimas para síntese de palmitato de cetila por esterificação já reportadas na literatura

Catalisador	Técnica de Imob.	Suporte	Condições reacionais	Conv. Máx.	Autor
lipase <i>Candida rugosa</i>	Adsorção física	Poliuretanos	RM: 1:1 (ácido:álcool) T: 50°C tempo: 5h Agitação: 100 rpm PB: 10% m/m	75– 97,3%	GUNCHEVA <i>et al.</i> (2011)
Zr-SBA-15	Encapsulação	Sílica	RM: 1:1(ácido:álcool) T: 162°C tempo: 6h Agitação: 520 rpm PB: 10% m/m	63,1%	MUTLU e YILMAZ (2016)
Novozym 435	Novozym 435	Resina acrílica macroporosa	RM: 1:1 (ácido:álcool) T: 80°C tempo: 6h Agitação: 520 rpm PB: 2,5% m/m	97- 100%	SERRANO-ARNALDOS <i>et al.</i> (2016)
lipase <i>Burkholderia cepacia</i> (BI-LI-OTM)	Adsorção física	Aerogel-LI	RM: 1:1,3 (ácido:álcool) T: 41°C tempo: 15h Agitação: 200 rpm PB: 14,8% m/m	95- 100%	Este trabalho

Apesar de ser utilizado o maior carregamento de biocatalisador imobilizado no meio reacional, também existe a possibilidade de futura pesquisa quanto a estabilidade do biocatalisador, avaliando os tempos de incubação, uma vez que já demonstrou ser bastante promissor quando aplicado na reação de hidrólise do azeite de oliva (Item 5.2.1) no qual apresentou hiperativação após oito dias de incubação, tornando aceitável o uso de relativa maior quantidade de biocatalisador ao sistema reacional.

Outra perspectiva de avaliação é quanto à qualidade do éster sintetizado. Por se tratar de um teste rápido e de fácil avaliação, a atividade emulsificante na interface água/óleo do palmitato de cetila sintetizado pela esterificação do álcool cetílico com o ácido palmítico utilizando o BI-LI-OTM como biocatalisador foi avaliada e é abordada com maior detalhe no próximo item.

5.4.1. Atividade Emulsificante

Os insumos químicos utilizados para a formulação dos muitos produtos desenvolvidos para cuidar da beleza, dentre eles o próprio palmitato de cetila, têm de ser adquiridos com um fabricante apto a garantir a sua procedência, armazenagem e a qualidade final. Algumas empresas têm atuado com o foco em prêmios e atestados de qualidade técnica afim de diferenciarem como os melhores fornecedores quanto comparadas a outras empresas. Na categoria de cosméticos naturais ou orgânicos, podemos citar alguns tipos de selo de qualidade, como por exemplo a Ecocert, que atua na inspeção e certificação de alimentos orgânicos e cosméticos naturais ou orgânicos (ECOCERT, site acessado em 28 de janeiro de 2018).

O potencial emulsificante do éster palmitato de cetila em substratos como hexano, óleo de coco virgem e óleo de coco bruto foi avaliado e comparado ao poder emulsificante do Tween 40 e do Triton X-100 nos mesmo substratos, por serem considerados bons agentes emulsificantes atuando como controle positivo do valor da atividade emulsificante. A demonstração do decaimento da emulsão é observada na Tabela 17 para o Hexano, Tabela 18 para o óleo virgem e na Tabela 19 para o óleo de coco bruto. As relações centesimais entre a altura da emulsão e a altura total, assim como a atividade emulsificante expressa em volume de emulsificante necessário para estabilizar a emulsão de 1% de fase hidrofóbica durante 24h, ($AE_{a/o}$) estão apresentadas no ANEXO 2, assim como também as fotografias referentes ao experimento.

De acordo com JACKISCH-MATSUURA *et al.* (2014) uma atividade emulsificante é considerada como alta quando A é maior ou igual a 1,8 cm, moderada com se encontra entre 1 e 1,7 cm e baixa quando A é menor que 1 cm. Desta maneira é possível obter informações quantitativas e qualitativas do processo de emulsificação utilizando diferentes emulsificantes e substratos.

Tabela 17. Demonstração do decaimento da emulsão formada pelo Hexano/Tween 40, Hexano/Triton X-100 e Hexano/palmitato de cetila incubados a 50°C

Hexano	Altura emulsionada (A) (cm)		
	Emulsificantes		
tempo (h)	Tween 40	Triton X-100	Palmitato de cetila
0	5,1	4,5	1,8
0,5	0,8	4,5	0,4
1	0,4	4,5	0,3
24	0	0,1	0,3
Taxa de decaimento (cm/h)	0,00	0,02	0,17

Tabela 18. Demonstração do decaimento da emulsão formada pelo Óleo de coco virgem /Tween 40, Óleo de coco virgem /Triton X-100 e Óleo de coco virgem /palmitato de cetila

Óleo de coco virgem	Altura emulsionada (A) (cm)		
	Emulsificantes		
tempo (h)	Tween 40	Triton X-100	Palmitato de cetila
0	5	6,2	4,7
0,5	5	6,2	4,1
1	5	6,2	3,5
24	3,8	3	2,5
Taxa de decaimento (cm/h)	0,76	0,48	0,53

Observa-se na Tabela 17 que depois de meia hora de incubação, a altura emulsionada do Tween 40 e do palmitato de cetila decaíram em mais da metade de sua emulsificação inicial de 5,1 para 0,8 cm e de 1,8 para 0,4 cm, respectivamente, enquanto que o Triton X-100 permaneceu estável por até 1h, decaindo depois de 24h de incubação de 4,5 para 0,1 cm. Apesar de formar menos emulsão, o palmitato de cetila é capaz de mantê-la de maneira mais eficaz quando comparado aos demais emulsificantes.

Partindo para uma análise qualitativa, inicialmente todos os emulsificantes testados obtiveram uma atividade emulsificante considerada boa, porém com o decorrer do tempo, o Triton X-100 foi o que manteve a qualidade superior. O motivo para o decaimento da emulsão

para todos os emulsificantes após 24h de incubação se deve provavelmente a evaporação do hexano, por estar incubado em uma temperatura próxima a do ponto de ebulição (68°C).

Tabela 19. Demonstração do decaimento da emulsão formada pelo Óleo de coco bruto/Tween 40, Óleo de coco bruto/Triton X-100 e Óleo de coco bruto/palmitato de cetila

Óleo de coco bruto	Altura emulsionada (A) (cm)		
	Emulsificantes		
tempo (h)	Tween 40	Triton X-100	Palmitato de cetila
0	5	6,2	4,8
0,5	5	6,2	0,3
1	5	6,2	0,3
24	3,8	3,1	0,3
Taxa de decaimento (cm/h)	0,76	0,50	0,06

No que concerne ao potencial de aplicação do palmitato de cetila quando comparado ao potencial de outro éster de cera, o oleato de oleíla, produzido pela lipase *Rhizopus* sp. (LOPES *et al.* 2011), o palmitato de cetila demonstra um maior potencial por manter a altura emulsionada em 0,3 cm para os tempos de 1h e 24h enquanto que o oleato de oleína manteve 0,2 cm para ambos os tempos, porém incubado à temperatura ambiente. Tornando o palmitato de cetila o éster mais apropriado para essa aplicação.

Já para a emulsificação do óleo de coco virgem (Tabela 18), observa-se que o palmitato de cetila demonstra um potencial emulsionante similar aos demais emulsificantes testados, exibindo baixo decaimento demonstrando uma ótima estabilidade de emulsão.

LOPES *et al.* (2011) também relata a aplicação do oleato de oleína na emulsificação de óleos vegetais, no caso, óleo de milho, demonstrando uma altura emulsionada de 0,4 cm após 1h e 0,1 cm após 24h de incubação, enquanto que o palmitato de cetila apresentou 3,5 cm e 2,5 cm, respectivamente para a emulsificação do óleo de coco virgem.

E finalmente, no que concerne a emulsificação do óleo de coco bruto (Tabela 19), o Tween 40 e o Triton X-100 demonstraram perfil similar ao demonstrado para a emulsificação do óleo de coco virgem (Tabela 18), porém o palmitato de cetila não foi capaz de manter o mesmo perfil, devido a provavelmente a presença de impurezas no sistema.

No entanto, analisando as fotografias expostas no ANEXO 2, observa-se que a emulsão formada pelo palmitato de cetila se comporta de uma maneira diferenciada quando comparada aos demais emulsificantes, promovendo formações de cristais da região emulsionada, onde esse comportamento é característico de emulsões Pickering. Nesse tipo de emulsão, cristais de cera formam um filme estável na superfície das gotículas da emulsão,

proporcionando uma barreira estérica, estabilizando a emulsão (ROUSSEAU *et al.*, 2013 e SZUMAŁA *et al.*, 2016)

ROUSSEAU *et al.*, (2013) propôs dividir emulsões Pickering em três tipos diferentes, dependendo do mecanismo de estabilização. O tipo I é criado por partículas que cristalizaram em torno das gotículas da fase dispersa. O tipo II é descrito como uma emulsão estabilizada por nano ou micropartículas adsorvidas na interface. Finalmente, as emulsões Pickering tipo III consistem em uma camada cristalina muito mais espessa do que o correspondente diâmetro das gotículas, circundando a gota e a mantendo em uma matriz cristalina.

Aplicando zoom e diminuindo a claridade na fotografia ilustrada no ANEXO 2, pode-se verificar a cristalização da região emulsionada com maior facilidade, onde é demonstrada Figura 27.

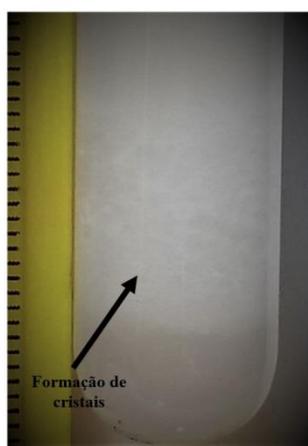


Figura 27. Cristalização da região emulsionada pelo palmitato de cetila em óleo de coco virgem.

Apesar do grande potencial do palmitato de cetila após apresentar a formação de cristais, quando observamos as Tabelas 17, 18 e 19, nota-se que há um decaimento na emulsão com o tempo. BINKS e ROCHER (2009) relatam a possibilidade de estabilizar misturas óleo-água usando partículas de cera isoladas, onde o efeito da temperatura foi explorado cuidadosamente.

Quando as partículas de cera são pré-adsorvidas nas interfaces de gota de água por emulsão à temperatura ambiente, após subsequente aumento da temperatura, há um aumento progressivo da sedimentação e coalescência à medida que as partículas se fundem e se desovem, onde a faixa de temperatura sobre a qual isso ocorre é semelhante à da faixa de fusão das partículas isoladas (BINKS e ROCHER 2009). Isso explica o decaimento das

emulsões formadas pelo palmitato de cetila após 24h, uma vez que as amostras foram incubadas a 50°C, temperatura próxima ao ponto de fusão do palmitato de cetila.

HODGE e ROUSSEAU (2003) reportam que a emulsão à temperatura ambiente deu origem a grandes cristais de cera, que foram ineficazes na estabilização da emulsão, porém quando ocorreu a sua posterior a fusão seguida de rápido resfriamento resultou em cristais de cera menores, o que lhes permite localizar e mover facilmente na interface e formar uma barreira estérica para evitar que as gotículas se juntem, fazendo com que houvesse uma rápida cristalização de partículas sólidas na fase de óleo, resultando na formação de sistemas de emulsão mais estáveis.

Desta maneira, abrem-se novas perspectivas para a aplicação do palmitato de cetila para a formação de emulsões mais estáveis do que as apresentadas nesta seção, favorecendo o desenvolvimento de processos mais benignos ao meio ambiente e menos onerosas, uma vez que o palmitato de cetila é um éster de cera de difícil obtenção na natureza sendo sintetizado isoladamente por rota enzimática, em temperatura amena e utilizando menos ácido palmítico.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho, que envolveu a otimização do carregamento de imobilização por adsorção física da lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) em aerogel e em aerogel modificado com líquido iônico, caracterização bioquímica na hidrólise do azeite de oliva, produção de ésteres etílicos, produção de éster de cera (palmitato de cetila) e avaliação do poder emulsificante do palmitato de cetila sintetizado permitiram as seguintes conclusões:

- Através dos estudos de isoterma e termodinâmica dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física em Aerogel-Controle e em aerogel modificado com líquido iônico (Aerogel-LI), foi possível observar que as interações suporte/enzima no processo de adsorção são apenas físicos e reversíveis;
- A interpretação dos modelos matemáticos serviu de apoio no estudo comportamental dos biocatalisadores quando aplicados em diferentes reações, o Aerogel-Controle adsorve a LBC seguindo o modelo de Redlich-Perterson, enquanto que o Aerogel-LI se comporta de acordo com Sips;
- A saturação do suporte controle na imobilização da LBC por adsorção física ocorreu primeiro que a do suporte modificado com LI em decorrência de sua maior área superficial e volume de poro promovido pelo uso desse aditivo. A partir disso, pode-se adotar o carregamento ótimo de imobilização para imobilização da LBC no Aerogel-LI ($337 \text{ mg/g}_{\text{suporte}}$) no Aerogel-Controle e ($297 \text{ mg/g}_{\text{suporte}}$);
- A modificação do aerogel com líquido iônico não alterou o pH de atuação do bicatalisador na hidrólise do azeite de oliva, pois foi observado uma melhor atuação no pH 7 e na temperatura de 40°C tanto para o biocatalisador imobilizado em Aerogel-LI (BI-LI) como para o imobilizado em Aerogel-Controle (BI-Controle);
- O BI-LI sofreu uma hiperativação devido a uma possível purificação da lipase imobilizada no suporte após longos períodos de incubação em solução tampão

de baixa força iônica tornando o seu sítio ativo mais exposto. Enquanto que o BI-Controle e a lipase livre permaneceram inativos nesse intervalo de tempo;

- A modificação com líquido iônico tornou o biocatalisador mais eficiente e com maior afinidade com o substrato na reação de hidrólise do azeite de oliva demonstrando uma maior velocidade máxima e menor constante de afinidade ($V_{\max} = 891,87 \text{ U/g}$ e $K_m = 214,26 \text{ mM}$) quando comparado com o BI-Controle ($V_{\max} = 681,24 \text{ U/g}$ e $K_m = 296,43 \text{ mM}$);

No que concerne a síntese de ésteres de interesse industrial foram testadas a produção de ésteres etílicos, objetivando uma perspectiva futura de aplicação em biocombustíveis, assim como também na síntese de ésteres de cadeia saturada (cera) com possível aplicação na indústria de cosméticos como emoliente;

- A modificação do biocatalisador com líquido iônico proporcionou um melhor potencial para ambas as aplicações, onde houve uma conversão de ésteres etílicos de 70% após 144h a 40°C e de palmitato de cetila de 95-100% na região de trabalho otimizada de 41°C, 15h agitação 200 rpm e percentual de biocatalisador de 14,8% m/m utilizando o biocatalisador imobilizado em aerogel modificado com líquido iônico com carregamento otimizado de LBC (BI-LI-OTM);
- O palmitato de cetila, éster de cera originado da esterificação do ácido palmítico com o álcool cetílico utilizando o BI-LI-OTM como biocatalisador, foi produzido utilizando baixa temperatura e menor concentração de ácido palmítico, fazendo com que o processo se torne competitivo;
- O poder emulsificante do palmitato de cetila foi testado e demonstrou um bom potencial sem prévia purificação frente ao óleo de coco virgem à 50°C, além disso, demonstrou formar emulsões do tipo Pickering, abrindo novas perspectivas de estudo e sua aplicação na indústria de cosméticos.

Portanto, verificou-se nessa pesquisa a importância do estudo de adsorção utilizando vários modelos matemáticos para melhor entendimento das interações enzima/suporte, fornecendo um apoio complementar para as explicações de demais fenômenos estudados neste trabalho, impactando diretamente nas reações de hidrólise de azeite de oliva, na transesterificação do óleo de coco bruto com o etanol e também na esterificação do ácido palmítico e álcool cetílico.

Capítulo 7

7. TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade e complementar o estudo realizado, sugere-se

- Realizar testes com outros tipos de imobilização, como a ligação multipontual;
- Realizar delineamento experimental para otimização do processo de produção de ésteres éticos;
- Testar a emulsificação do palmitato de cetila em diferentes temperaturas
- Testar a emulsificação na interface óleo/água;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do palmitato de cetila frente a microorganismos de diferentes níveis tróficos;

Capítulo 8

8. LISTA DE DIVULGAÇÃO

Esta dissertação de mestrado foi realizada ao longo de 24 meses de estudo, até o presente momento publicaram-se os resultados em diferentes meios de divulgação, como a seguir listadas:

- 1) Lisboa, M.C.; Rodrigues, C.A.; Barbosa, A.S.; Mendonca, F.M.R.; Mattedi, S.; Mendes, A.A.; Dariva, C.; Franceschi, E.; Lima, A.S.; Soares, C.M.F. Isotherm adsorption studies in the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* on chemically modified sílica aerogel particles. XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2017. v. 2.
- 2) Lisboa, M.C.; Rodrigues, C.A.; Barbosa, A.S.; Mendonca, F.M.R.; Mattedi, S.; Mendes, A.A.; Dariva, C.; Franceschi, E.; Lima, A.S.; Soares, C.M.F. Thermodynamic studies of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on sílica aerogel modified with protic ionic liquid. XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2017. v. 2.
- 3) Rodrigues, C.A.; Lisboa, M.C.; Dariva, C.; Franceschi, E.; Lima, A. S.; Soares, C.M.F. Caracterização bioquímica da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em aerogel modificado com líquido iônico. SEMPESQ – Semana de pesquisa - UNIT, Aracaju, 2017.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDULLA, R.; POGAKU R. Immobilized *Burkholderia Cepacia* Lipase for Biodiesel Production from Crude *Jatropha Curcas* L. Oil, *Biomass and Bioenergy*, 56, p. 8-13, 2013.
- AGARWAL, D., AGARWAL, A.K. Performance and emissions characteristics of *Jatropha* oil (preheated and blends) in a direct injection compression ignition engine, *Applied Thermal Engineering*, 27, p. 2314-2323, 2007.
- ALBERGHINA L. **Protein engineering in industrial biotechnology**. CRC Press, Boca Raton pp. 376, 2000.
- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase Immobilisation: An Equilibrium Study of Lipases Immobilised on Hydrophobic and Hydrophilic/hydrophobic Supports, *Biochemical Engineering Journal*, 4(3), p. 207–15, 2000.
- ALVES, M. D.; ARACRI F.M., CREN É.C.; MENDES A.A. Isotherm, Kinetic, Mechanism and Thermodynamic Studies of Adsorption of a Microbial Lipase on a Mesoporous and Hydrophobic Resin, *Chemical Engineering Journal*, 311, p. 1-12, 2017.
- ALVES, M.D.; CREN É.C.; MENDES A.A. Kinetic, Thermodynamic, Optimization and Reusability Studies for the Enzymatic Synthesis of a Saturated Wax Ester, *Journal of Molecular Catalysis B.*, 133, p. 377-387, 2016.
- BADGUJAR, V.C.; BADGUJAR, K.C.; YEOLE, P.M.; BHANAGE, B.M. Immobilization of *Rhizomucor miehei* Lipase on a Polymeric Film for Synthesis of Important Fatty Acid Esters: Kinetics and Application Studies, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(10), p. 1463–78, 2017.
- BARBOSA, A.D.S.; LISBOA, J.A.; SILVA, M.A.O.; CARVALHO, N.B.; PEREIRA, M.M.; FRICKS, A.T.; MATTEDI, S.; LIMA, Á.S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C.M. F. The Novel Mesoporous Sílica Aerogel Modified with Protic Ionic Liquid for Lipase Immobilization, *Química Nova*, 39(4), p. 415–22, 2016.
- BARBOSA, A.D.S.; SILVA, M.A.O.; CARVALHO, N.B.; MATTEDI, S; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A.T; LIMA, Á.S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C.M. F. Immobilization of Lipase By Encapsulation in Sílica Aerogel, *Química Nova*, 37(6), p. 969–76, 2014.

- BASSO, A.; DE MARTIN, L.; EBERT, C.; GARDOSI, L.; TOMAT, A.; CASARCI, M.; ROSI, O.L. A Novel Support for Enzyme Adsorption: Properties and Applications of Aerogels in Low Water Media, *Tetrahedron Letters*, 41(44), p. 8627–30, 2000.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J.M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, p. 486–493, 1998.
- BELCHETZ, P., CRAWLEY, J.C.W.; BRAIDMAN, I; GREGORIADIS, G. Treatment of Gaucher's disease with liposome-entrapped glucocerebrosidase: β -glucosidase. *The Lancet* 310(8029), p. 116–17, 1977.
- BELOZERSKY. Disponível em: <https://biokinet.belozersky.msu.ru/content/pymol-tutorial-animating-structure-function-relationship-protein-molecule>, consultado em 18/01/2018,
- BHUIYA, M. M. K.; RASUL, M. G.; KHAN, M. M. K.; ASHWATH, N.; AZAD, A. K. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel—Part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, p. 1109-1128, 2016.
- BINKS, B.P.; ROCHER A. Effects of Temperature on Water-in-Oil Emulsions Stabilised Solely by Wax Microparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 335(1), p. 94–104, 2009.
- BIROLI, W.G.; FERREIRA, I.M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D.D.A.; DE MATOS, I.L.; COMASSETO, J.V.; PORTO, A.L. Biocatalysis; Biotransformation in Brazil: An Overview, *Biotechnology Advances*, p. 1–30, 2015.
- BŁASZCZYŃSKI, T.Z; ŚLOSARCZYK, A.; MORAWSKI, M. Synthesis of Sílica Aerogel by Supercritical Drying Method, *Procedia Engineering* 57: 200–206, 2013.
- BON, E. P. S.; FERRARA M. A.; CORVO M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Inteciência, 2008.
- BORNSCHEUER, U.; REIF, O. W.; LAUSCH, R.; FREITAG, R.; SCHEPER, T.; KOLISIS, F.N.; MENGE, U. Lipase of *Pseudomonas cepacia* for Biotechnological Purposes: Purification, Crystallization and Characterization, *BBA - General Subjects*, 1201(1), p. 55–60, 1994.
- BOUAID, A.; ACHERKI, H.; GARCÍA, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic Butanolysis of Coconut Oil. Biorefinery Approach, *Fuel*, 209, p. 141–49, 2017.

- BUISSON, P.; HERNANDEZ, C.; PIERRE, M.; PIERRE, A.C. Encapsulation of Lipases in Aerogels, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 285(1–3), p. 295–302, 2001
- BUISSON, P.; PIERRE, A.C. Immobilization in Quartz Fiber Felt Reinforced Sílica Aerogel Improves the Activity of *Candida rugosa* Lipase in Organic Solvents, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1–4), p. 77–82, 2006.
- CAO, L. **Immobilized enzymes: science or art?** *Current opinion in chemical biology*, 9(2), p. 217-226. 2005.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Quimica Nova*, 38(3), p. 399–409, 2014.
- CESARINI S.; DIAZ P.; NIELSEN P. M. Exploring a New, Soluble Lipase for FAMES Production in Water-Containing Systems Using Crude Soybean Oil as a Feedstock. *Process Biochemistry*, 48(3), p. 484–87, 2013.
- CHINNAMMA, M.; BHASKER, S.; MADHAV H.; DEVASIA, R. M.; SHASHIDHARAN, A.; PILLAI, B. C.; THEVANNOOR, P. Production of coconut methyl ester (CME) and glycerol from coconut (*Cocos nucifera*) oil and the functional feasibility of CME as biofuel in diesel engine. *Fuel*, 140, p.4-9, 2015.
- CHOI, J.M.; HAN S.S.; KIM, H.S. Industrial Applications of Enzyme Biocatalysis: Current Status and Future Aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), p. 1443–54, 2015.
- CLARKE, M.R. Structure and Proportions of the Spermaceti Organ in the Sperm Whale. *F. mar. bio. Ass. UK*, 58, p. 1–17, 1978.
- COMIN, L. M.; TEMELLI F.; SALDAÑA, M. D. A. Barley Beta-Glucan Aerogels via Supercritical CO₂ Drying. *Food Research International*, 48(2), p. 442–48, 2012.
- COSTA-SILVA, T.A.; CARVALHO, A.K.F.; SOUZA, C.R.F.; DE CASTRO, H.F.; SAID, S.; OLIVEIRA, W.P. Enzymatic Synthesis of Biodiesel Using Immobilized Lipase on a Non-Commercial Support. *Energy & Fuels*, 30(6), p. 4820–24, 2016.
- COSTA-SILVA, T.A.; CARVALHO, A.K.F.; SOUZA, C.R.F.; DE CASTRO, H.F.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Enzymatic Transesterification of Coconut Oil Using Chitosan-Immobilized Lipase Produced by Fluidized-Bed System. *Energy & Fuels*, 31(11), p. 12209-12216, 2017.
- CRISP S.; EATON R. F.; TINSLEY H. M. Scheme for the identification of sperm whale oil and its products in commercial formulations and in leather articles. *Analyst*, 109(11), 1497-1502, 1984.

- DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, 27(4), 623-630, 2004.
- DAVE, B. C.; SOYEZ, H.; MILLER, J. M.; DUNN, B.; VALENTINE, J. S.; ZINK, J. I. Synthesis of protein-doped sol-gel SiO₂ thin films: evidence for rotational mobility of encapsulated cytochrome c. *Chemistry of materials*, 7(8), p. 1431-1434, 1995.
- DE LOS RIOS, A.P.; HERNANDEZ-FERNANDEZ, F. J.; GOMEZ, D.; RUBIO, M.; VILLORA, G. Enhancement of activity and selectivity in lipase catalyzed transesterification in ionic liquids by the use of additives. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 82, p. 882–887, 2007.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy conversion and management*, 50, p. 14-34, 2009.
- DOLATABADI, J. E. N.; DE LA GUARDIA, M. Applications of Diatoms and Sílica Nanotechnology in Biosensing, Drug and Gene Delivery, and Formation of Complex Metal Nanostructures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(9), p. 1538–48, 2011.
- DUNN, B.; MILLER, J. M.; DAVE, B. C.; VALENTINE, J.S.; ZINK, J.I. Strategies for encapsulating biomolecules in sol–gel matrices. *Acta Materialia*, 46(3), 737-741, 1998.
- DUTTA, R. **Fundamentals of biochemical engineering**. Ane Books India, Springer, 2008.
- ECOCERT. Disponível em: <http://www.brazil.ecocert.com/>. Acessado em 28 de janeiro de 2018.
- EDMISTON, P.L.; WAMBOLT, C.L.; SMITH, M.K.; SAAVEDRA, S.S. Spectroscopic Characterization of Albumin and Myoglobin Entrapped in Bulk Sol-Gel Glasses. *Journal of Colloid and Interface Science*, 163(2), p. 395–406, 1994.
- EL RASSY, H.; MAURY, S.; BUISSON, P.; PIERRE, A.C. Hydrophobic Sílica Aerogel-Lipase Biocatalysts Possible Interactions between the Enzyme and the Gel. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 350, p. 23–30, 2004.
- EL RASSY, H.; PERRARD, A.; PIERRE, A.C. Application of Lipase Encapsulated in Sílica Aerogels to a Transesterification Reaction in Hydrophobic and Hydrophilic Solvents: Bi-Bi Ping-Pong Kinetics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(3–4), p. 137–50, 2004.

- FERNANDEZ, I. A. P.; LIU, D. H.; ZHAO, J. LCA studies comparing alkaline and immobilized enzyme catalyst processes for biodiesel production under Brazilian conditions. *Resources, Conservation and Recycling*, 119, p.117-127, 2017.
- FOO, K.Y.; HAMEED, B.H. Insights into the Modeling of Adsorption Isotherm Systems. *Chemical Engineering Journal*, 156(1), p. 2–10, 2010.
- GANDHI, N.N. Applications of Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(6), p. 621–34, 1997.
- GAO, S.; WANG, W.; WANG, Y.; LUO, G.; DAI, Y. Influence of alcohol treatments on the activity of lipases immobilized on methyl-modified sílica aerogels. *Bioresource technology*, 101(19), p. 7231-7238, 2010b.
- GAO, S.; WANG, Y.; WANG, T.; LUO, G.; DAI, Y. Immobilization of lipase on methyl-modified sílica aerogels by physical adsorption. *Bioresource technology*, 100(2), 996-999, 2009.
- GAO, S.; WANG, Y.; WANG, W.; LUO, G.; DAI, Y. Enhancing performance of lipase immobilized on methyl-modified sílica aerogels at the adsorption and catalysis processes: Effect of cosolvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(3-4), p. 218-224, 2010a.
- GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353(16), p. 2885–2904, 2011.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A.; CAMINO-REY, M. C.; ALNAIEF, M.; ZETZL, C.; SMIRNOVA, I. Supercritical drying of aerogels using CO₂: Effect of extraction time on the end material textural properties. *The Journal of Supercritical Fluids*, 66, 297-306. 2012.
- GHAFAR, A.; GURIKOV, P.; SUBRAHMANYAM, R.; PARIKKA, K.; TENKANEN, M.; SMIRNOVA, I., MIKKONEN, K.S. Mesoporous guar galactomannan based biocomposite aerogels through enzymatic crosslinking. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 94, 93-103, 2017.
- GOTTFRIED, D.S.; KAGAN, A.; HOFFMAN, B.M.; FRIEDMAN, J.M. Impeded Rotation of a Protein in a Sol-Gel Matrix. *Journal of Physical Chemistry*, 103, p. 2803–7, 1999.
- GRANADOS, M. L.; ALBA-RUBIO, A. C.; VILA, F.; ALONSO, D.M.; MARISCAL, R. Surface chemical promotion of Ca oxide catalysts in biodiesel production reaction by

- the addition of monoglycerides, diglycerides and glycerol. *Journal of catalysis*, 276(2), p. 229-236, 2010.
- GUISAN, J.M. **Immobilization of enzymes and cells**. Springer Science & Business Media, 22, 2006.
- GUNCHEVA, M., TASHEV, E., ZHIRYAKOVA, D., TOSHEVA, T., TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: application in wax ester synthesis. *Process biochemistry*, 46(4), 923-930, 2011.
- HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review, *Bioresource Technology*, 89(1), p. 17–34, 2003
- HODGE, S.M.; ROUSSEAU, D. Flocculation and Coalescence in Water-in-Oil Emulsions Stabilized by Paraffin Wax Crystals, *Food Research International*, 36(7), p. 695–702, 2003.
- HOLLOWAY, P.J. The chromatographic analysis of spermacti. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20 (10), p.775-779, 1968.
- HRUBESH, L.W. Aerogel applications. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 225, 335-342, 1998.
- ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C. Enzyme reactors. In: ILLANES, A. (Ed.). **Enzyme Biocatalysis: principles and applications**, pp. 205-251, Springer, Dordrecht, 2008.
- IQBAL, J.; IQBAL, S.; MULLER, C.E. Advances in Immobilized Enzyme Microbioreactors in Capillary Electrophoresis, *RSC Publishing*, 138, p. 3104–16, 2013.
- JACKISCH-MATSUURA, A. B.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M.N., FARIA, A.F.D., MATSUURA, T., GROSSMAN, M.J., DURRANT, L.R. Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 138-144, 2014.
- JAEGER, K.E; REETZ, M.T. Microbial Lipases Form Versatile Tools for Biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 16(9), p. 396–403, 1998.
- JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V.; YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorulaglutinis* IIP-30. *Biotechnology letters*, 14(6), 487-490, 1992.
- KAROUT, A.; PIERRE A.C., Sílica Xerogels and Aerogels Synthesized with Ionic Liquids, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 353(30–31), p. 2900–2909, 2007.

- KAZLAUSKAS, R.J.; WEISSFLOCH, A.N.; RAPPAPORT, A.T.; CUCCIA, L.A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(8), 2656-2665, 1991.
- KHANAHMADI, S.; YUSOF, F.; ONG, H.C.; AMID, A.; SHAH, H. Cocoa pod husk: A new source of CLEA-lipase for preparation of low-cost biodiesel: An optimized process. *Journal of biotechnology*, 231, p. 95-105, 2016.
- KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y. T.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on sílica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*, 46(5), p. 1083-1089, 2011.
- KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S.W. THE Crystal Structure of a Triacylglycerol Lipase from *Pseudomonas Cepacia* Reveals a Highly Open Conformation in the Absence of a Bound Inhibitor, *Structure*, 5(2), p. 173–85, 1997.
- KUO, C. H.; CHEN, H. H.; CHEN, J. H.; LIU, Y. C.; SHIEH, C. J. High Yield of Wax Ester Synthesized from Cetyl Alcohol and Octanoic Acid by Lipozyme RMIM and Novozym 435, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), p. 11694–704, 2012.
- LAGE, F. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H.; MENDES, A. A. Preparation of a Biocatalyst via Physical Adsorption of Lipase from *Thermomyces Lanuginosus* on Hydrophobic Support to Catalyze Biolubricant Synthesis by Esterification Reaction in a Solvent-Free System, *Enzyme and Microbial Technology*, 84, p. 56–67, 2016.
- LEE, S. H.; DOAN, T. T. N.; HA, S. H.; KOO, Y. M. Using Ionic Liquids to Stabilize Lipase within Sol-Gel Derived Sílica, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(1–2), p. 57–61, 2007.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 839p, 2000
- LI, K.; FAN, Y.; HE, Y.; ZENG, L.; HAN, X.; YAN, Y. *Burkholderia cepacia* lipase Immobilized on Heterofunctional Magnetic Nanoparticles and Its Application in Biodiesel Synthesis, *Scientific Reports*, 7(1), p. 1–17, 2017.
- LI, T; WANG, T. Preparation of Sílica Aerogel from Rice Hull Ash by Drying at Atmospheric Pressure, *Materials Chemistry and Physics*, 112(2), p. 398–401, 2008.

- LIU, T.; LIU, Y.; WANG, X.; LI, Q.; WANG, J.; YAN, Y. Improving Catalytic Performance of *Burkholderia cepacia* Lipase Immobilized on Macroporous Resin NKA, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(1–2), p. 45–50, 2011.
- LOPES, D.B.; DUARTE, M.C.T.; MACEDO, G.A. Biosynthesis of Oleyl Oleate Wax Ester by Non-Commercial Lipase, *Food Science and Biotechnology*, 20(5), p. 1203–9, 2011.
- MA, H.Z.; YU, X. W.; SONG, C.; XUE, Q. L.; JIANG, B. Immobilization of Candida Antarctica Lipase B on Epoxy Modified Sílica by Sol-Gel Process, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, p. 76–81, 2016.
- MARTINS, S.R.; DOS SANTOS, A.; FRICKS, A.T.; LIMA, Á.S.; MATTEDI, S.; SILVA, D. P.; SOARES, C.M.F, CABRERA-PADILLA, R.Y. Protic ionic liquids influence on immobilization of Lipase *Burkholderia cepacia* on hybrid supports. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(3), 633-64, 2017.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R, Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), p. 1451–63, 2007.
- MAURY, S.; BUISSON, P.; PERRARD, A.; PIERRE, A.C. Influence of the Sol-Gel Chemistry on the Activity of a Lipase Encapsulated in a Sílica Aerogel, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29(1–6), p. 133–48, 2004.
- MAURY; S.; BUISSON, P.; PERRARD, A.; PIERRE, A.C. Catalytic Activity of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* Encapsulated in Sílica Aerogels in Esterification and Hydrolysis as a Function of the Gel and Solvent Hydrophobicities, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19–20, p. 269–78, 2002.
- MAURY; S.; BUISSON, P.; PERRARD, A.; PIERRE, A.C. Compared Esterification Kinetics of the Lipase from *Burkholderia cepacia* Either Free or Encapsulated in a Sílica Aerogel, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32(5–6), p. 193–203, 2005.
- MENAA, B.; HERRERO, M.; RIVES, V.; LAVRENKO, M.; EGGERS, D. K. Favourable influence of hydrophobic surfaces on protein structure in porous organically-modified sílica glasses. *Biomaterials*, 29, p. 2710–18, 2008.
- MERCKMILLIPORE. Disponível em:
<http://www.merckmillipore.com/BR/pt?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.br%2F> . Acessado em 12/01/18.

- MESSING, R.A. Adsorption; Inorganic Bridge Formations, In: Klaus, M. (Ed.) **Methods in Enzymology**, 44, p. 148–169, Academic Press: Waltham, MA, USA, 1976.
- MICHELIN, S.; PENHA, F. M.; SYCHOSKI, M. M.; SCHERER, R. P.; TREICHEL, H.; VALÉRIO, A., OLIVEIRA, J. V. Kinetics of Ultrasound-Assisted Enzymatic Biodiesel Production from Macauba Coconut Oil, *Renewable Energy*, 76, p. 388–93, 2015.
- MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of Biocatalysts for Enzymatic Polymerizations: Possibilities, Advantages, Applications, *Bioresource Technology*, 115, p. 126–35, 2012.
- MIRANDA, J.S.; SILVA, N.C.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.; LAGE, F.A.; HIRATA, D.B.; MENDES, A.A. Immobilization of *Thermomyces Lanuginosus* Lipase on Mesoporous Poly-Hydroxybutyrate Particles and Application in Alkyl Esters Synthesis: Isotherm, Thermodynamic and Mass Transfer Studies, *Chemical Engineering Journal*, 251, p. 392–403, 2014.
- MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*, 77(2), p. 593-605, 2008.
- MORRIS, R.J. The lipid structure of the spermaceti organ of the sperm whale (*Physeter catodon*). *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 20 (10), p. 911-916, 1973.
- MUKHERJEE, I.; MYLONAKIS, A.; GUO, Y.; SAMUEL, S. P.; LI, S.; WEI, R. Y.; WEI, Y. Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous sílica nanospheres. *Microporous and Mesoporous Materials*, 122, p. 168-174, 2009.
- MULHOLLAND, K.L.; SYLVESTER, R.W.; DYER, J.A., Sustainability: waste minimization, green chemistry and inherently safer processing. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 19(4), 260-268, 2000.
- MUTLU, V.N.; YILMAZ, S. Esterification of Cetyl Alcohol with Palmitic Acid over WO₃/Zr-SBA-15 and Zr-SBA-15 Catalysts, *Applied Catalysis A: General*, 522, p. 194–200, 2016.
- NASSREDDINE, S.; KAROUT, A.; CHRIST, M.L.; PIERRE, A.C. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a sílica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase, *Applied Catalysis A: General*, 344(1-2), p. 70-77, 2008.
- NEETHIRAJAN, S.; GORDON, R.; WANG, L. Potential of sílica bodies (phytoliths) for nanotechnology, *Trends in biotechnology*, 27(8), 461-467, 2009.

- NOVAK, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V.; KNEZ, Ž. Sílica aerogels as supports for lipase catalyzed esterifications at sub-and supercritical conditions. *The Journal of supercritical fluids*, 27(2), 169-178, 2003.
- OLIVEIRA, M.V.S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; DE CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á.S. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. *Acta Scientiarum. Technology*, 36(3), 2014.
- ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A.C. Application of sílica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(3-4), p.106-113, 2006.
- PALJEVAC, M.; PRIMOŽIČ M.; HABULIN, M.; NOVAK, Z.; KNEZ, Ž. Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on sílica gels at low and high pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(1), p. 74-80, 2007.
- PAPADAKI, A.; MALLOUCHOS, A.; EFTHYMIU, M. N.; GARDELI, C.; KOPSAHELIS, N.; AGUIEIRAS, E. C.; KOUTINAS, A. A. Production of wax esters via microbial oil synthesis from food industry waste and by-product streams. *Bioresource technology*, 245, 274-282, 2017.
- PENCREACH, G.; LEULLIER, M.; BARATTI, J.C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and bioengineering*, 56(2), p.181-189, 1997.
- PIERRE, A.; BUISSON, P. Influence of the Porous Texture of Sílica Gels on the Enzymatic Activity of Lipases in Esterification Reactions. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 11(4-6): p.639-47, 2001.
- PROTOLAB, disponível em: <http://www.protolab.com.br/Tabela-Condutividade-Material-Construcao.htm>, consultado em 18/01/2018
- RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L. J.; MANDAL, A. B.; SEKARAN, G. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: isotherm and kinetic studies. *Process biochemistry*, 47(3), 435-445, 2012.
- REETZ, M. T.; TIELMANN, P.; WIESENHÖFER, W.; KÖNEN, W.; ZONTA, A. Second generation sol-gel encapsulated lipases: Robust heterogeneous biocatalysts. *Advanced synthesis & catalysis*, 345(6-7), p. 717-728, 2003.

- REIS, P., HOLMBERG, K.; DEBECHE, T.; FOLMER, B.; FAUCONNOT, L.; WATZKE, H. Lipase-catalyzed reactions at different surfaces. *Langmuir*, 22(19), p. 8169-8177, 2006.
- RIBEIRO, L.M.; SANTOS, B.C.D.S.; ALMEIDA, R.M. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. *Biomass and bioenergy*, 47, p.498-503, 2012.
- RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), p. 6290-6307, 2013.
- ROUSSEAU, D. Trends in structuring edible emulsions with Pickering fat crystals. *Current opinion in colloid & interface science*, 18(4), p.283-291, 2013.
- RUHUL, A. M.; KALAM, M.A.; MASJUKI, H.H.; FATTAH, I.R.; REHAM, S.S.; RASHED, M.M. State of the art of biodiesel production processes: a review of the heterogeneous catalyst. *RSC Advances*, 5(122), p. 101023-101044, 2015.
- SÁNCHEZ, D. A.; TONETTO, G. M.; FERREIRA, M. L. *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and bioengineering*, 2017.
- SARNEY, D.B.; FREGAPANE, G.; VULFSON, E.N. Lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a continuous bioreactor. *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 71, p. 93–96, 1994.
- SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817), 258, 2001.
- SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGENDORF, T.; HECHT, H. J.; STRICKLAND, L.C. The open conformation of a *Pseudomonas lipase*. *Structure*, 5(2), p. 187-202, 1997.
- SCHULTZ, J.M.; JENSEN, K.I.; KRISTIANSEN, F.H. Super insulating aerogel glazing. *Solar energy materials and solar cells*, 89(2-3), p. 275-285, (2005).
- SECUNDO F.; CARREA, G; TARABIONO, C; GATTI-LAFRANCONI, P; BROCCA, S; LOTTI, M; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J Mol Catal B: Enzym* 39(1): p. 166-170, 2006.
- SERRANO-ARNALDOS, M.; MÁXIMO-MARTÍN, M. F.; MONTIEL-MORTE, M. C.; ORTEGA-REQUENA, S.; GÓMEZ-GÓMEZ, E.; BASTIDA-RODRÍGUEZ, J. Solvent-free enzymatic production of high quality cetyl esters. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(4), p.641-649, 2016.

- SHELDON, R.A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235, 2013.
- SILVA, N. C.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A.A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochemical engineering journal*, 82, 139-149, 2014.
- SIMONETTI, E. A. N.; THIM, G. P.; CORTEZ, G. G. Ca-Al hydrotalcites as catalysts for methanolysis and ethanolysis of soybean oil. *Modern Research in Catalysis*, 3(04), p.117, 2014.
- SKUBISZEWSKA-ZIĘBA, J.; KHALAMEIDA, S.; SYDORCHUK, V. Comparison of surface properties of sílica xero-and hydrogels hydrothermally modified using mechanochemical, microwave and classical methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 504, p.139-153, 2016.
- SOARES, C. M.F; DOS SANTOS, O. A.; OLIVO, J. E.; DE CASTRO, H. F.; DE 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*, 29(1-6), p. 69-79, 2004.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L.S.; IGLESIAS, M., MATTEDI, S., ZANIN, G.M.; SANTOS, O.A.A.; COUTINHO, J.A.P.; LIMA, A.S; SOARES, C. M. F. Protic Ionic Liquid as Additive on Lipase Immobilization Using Sílica Sol-Gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(3), p. 141-50, 2013.
- STORM, G.; VINGERHOEDS, M.H.; CROMMELIN, D.J.; HAISMA, H.J. Immunoliposomes bearing enzymes (immuno-enzymosomes) for site-specific activation of anticancer prodrugs. *Advanced drug delivery reviews*, 24(2-3), p.225-231, 1997.
- SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S.Q. Lipase-catalysed transesterification of coconut oil with fusel alcohols in a solvent-free system. *Food Chemistry*, 134(1), p. 89-94, 2012.
- SUNITHA, S.; KANJILAL, S.; REDDY, P. S.; PRASAD, R. B. Liquid-liquid biphasic synthesis of long chain wax esters using the Lewis acidic ionic liquid choline chloride-2ZnCl₂. *Tetrahedron Letters*, 48(39), p. 6962-6965, 2007.
- SZUMAŁA, P.; LUTY, N. Effect of different crystalline structures on W/O and O/W/O wax emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 499, 131-140, 2016.

- TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers?. *Trends in biotechnology*, 17(8), 326-335, 1999.
- TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Immobilization of *Burkholderia* sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. *Journal of biotechnology*, 158(3), p. 112-119, 2012.
- TRODLER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *BMC structural biology*, 9(1), p.38, 2009.
- TU, M.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Adsorption of Cellulase on Cellulolytic Enzyme Lignin from Lodgepole Pine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), p. 7771–78, 2009.
- TUPUFIA, S.C.; JEON, Y. J.; MARQUIS, C.; ADESINA, A. A.; ROGERS, P. L. Enzymatic conversion of coconut oil for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 106, p. 721-726, 2013.
- UNGCHAROENWIWAT, P.; ARAN, H. Purification and characterization of lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 isolated from wastewater from a canned fish factory and its application for the synthesis of wax esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115, p. 96-104, 2015.
- UNGCHAROENWIWAT, P.; CANYUK, B.; ARAN, H. Synthesis of jatropha oil based wax esters using an immobilized lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 and Lipozyme RM IM. *Process Biochemistry*, 51(3), p.392-398, 2016.
- VAN DEN BROEK, L.A.; BOERIU, C.G. Enzymatic synthesis of oligo-and polysaccharide fatty acid esters. *Carbohydrate polymers*, 93(1), p. 65-72, 2013.
- VAN KASTEREN, J.M.N.; NISWORO, A.P. A process model to estimate the cost of industrial scale biodiesel production from waste cooking oil by supercritical transesterification. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(4), p. 442-458, 2007.
- VENKATESAGOWDA, B.; PONUGUPATY, E.; BARBOSA-DEKKER, A. M.; DEKKER, R.F. The Purification and Characterization of Lipases from *Lasiodiplodia theobromae*, and Their Immobilization and Use for Biodiesel Production from Coconut Oil. *Applied biochemistry and biotechnology*, p. 1-22, 2017.
- VERGER, R.; DE HAAS, G. H. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 5(1), 77-117, 1976.
- VILA-REAL, H.; ALFAIA, A. J.; ROSA, J. N.; GOIS, P. M.; ROSA, M. E.; CALADO, A.R.; RIBEIRO, M.H. α -Rhamnosidase and β -glucosidase expressed by naringinase

- immobilized on new ionic liquid sol–gel matrices: Activity and stability studies. *Journal of biotechnology*, 152(4), p. 147-158, 2011.
- 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*, 9(4-6), p.113-148, 2000.
- VIOUX, A.; VIAU, L.; VOLLAND, S.; LE BIDEAU, J. Use of ionic liquids in sol-gel; ionogels and applications. *Comptes Rendus Chimie*, 13(1-2), p. 242-255, 2010.
- WAWRZYNIAK, R.; WASIAK, W.; FRACKOWIAK, M. Determination of methyl esters in diesel oils by gas chromatography-validation of the method. *Chemical Papers-Slovak Academy of Sciences*, 59 (6B), p. 449, 2005.
- WEBB, E.C. Enzyme nomenclature. In: **Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes** (No. Ed. 6). Academic Press, 1992.
- WEBER, T.W., CHAKRAVORTI, R.K. Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers. *AIChE Journal*, 20(2), p. 228-238, 1974.
- WEISSFLOCH, A.N.; KAZLAUSKAS, R.J. Enantioference of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(21), p.6959-6969, 1995.
- WILSON, K.; WALKER, J. (Eds.). **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. Cambridge university press, 2010.
- WOO, C.; KOOK, S.; HAWKES, E. R.; ROGERS, P. L.; MARQUIS, C. Dependency of engine combustion on blending ratio variations of lipase-catalysed coconut oil biodiesel and petroleum diesel. *Fuel*, 169, p.146-157, 2016.
- ZARCULA, C.; CORÎCI, L.; CROITORU, R.; URSOIU, A.; PETER, F. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol–gel method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65(1-4), p.79-86, 2010.
- ZHANG, X.; ZHENG, F.; YE, L.; XIONG, P.; YAN, L.; YANG, W.; JIANG, B. A one-pot sol–gel process to prepare a superhydrophobic and environment-resistant thin film from ORMOSIL nanoparticles. *RSC Advances*, 4(19), 9838-9841, 2014.

ZUYI, T.; TAIWEI, C. On the applicability of the Langmuir equation to estimation of adsorption equilibrium constants on a powdered solid from aqueous solution. *Journal of colloid and interface science*, 231(1), p.8-12. 2000.

ANEXO 1

Nesta sessão de anexos serão apresentadas informações suplementares referente a transesterificação do óleo de coco bruto utilizando o biocatalisador imobilizado aerogel modificado com líquido iônico no carregamento otimizado de lipase *Burkholderia cepacia* (BI-LI-OTM), assim como também a reação nas mesmas condições sem a presença do biocatalisador.

Tabela A.1.1. Composição do óleo de coco bruto utilizado para as reações de transesterificação realizadas pelo BI-Controle, BI-LI e BI-LI-OTM para a obtenção de ésteres etílicos

Pico	tempo de retenção (min)	Ácido Graxo	Fórmula
1	5,91	Caproico	C ₆ H ₁₂ O ₂
2	8,16	Caprílico	C ₈ H ₁₆ O ₂
3	11,04	Cáprico	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
4	13,98	Láurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
5	16,748	Mirístico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
6	19,302	Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
7	19,73	Heptadecanoato de Metila*	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
8	21,729	Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
9	21,786	Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
10	22,121	Esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
12	22,526	Lignocérico	C ₂₄ H ₄₈ O ₂

* Padrão Interno

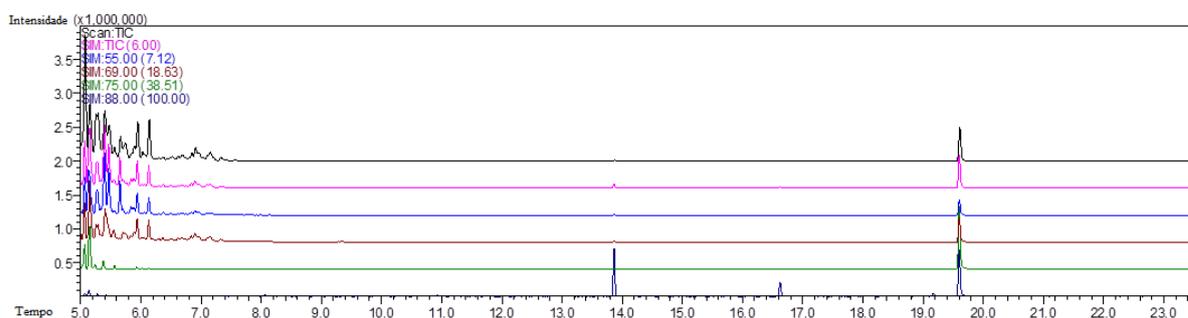


Figura A.1.1. Cromatograma em modo SIM de quantificação dos ésteres etílicos para óleo de coco bruto e etanol (1:7) após 144h de reação em batelada à 40°C sem biocatalisador.

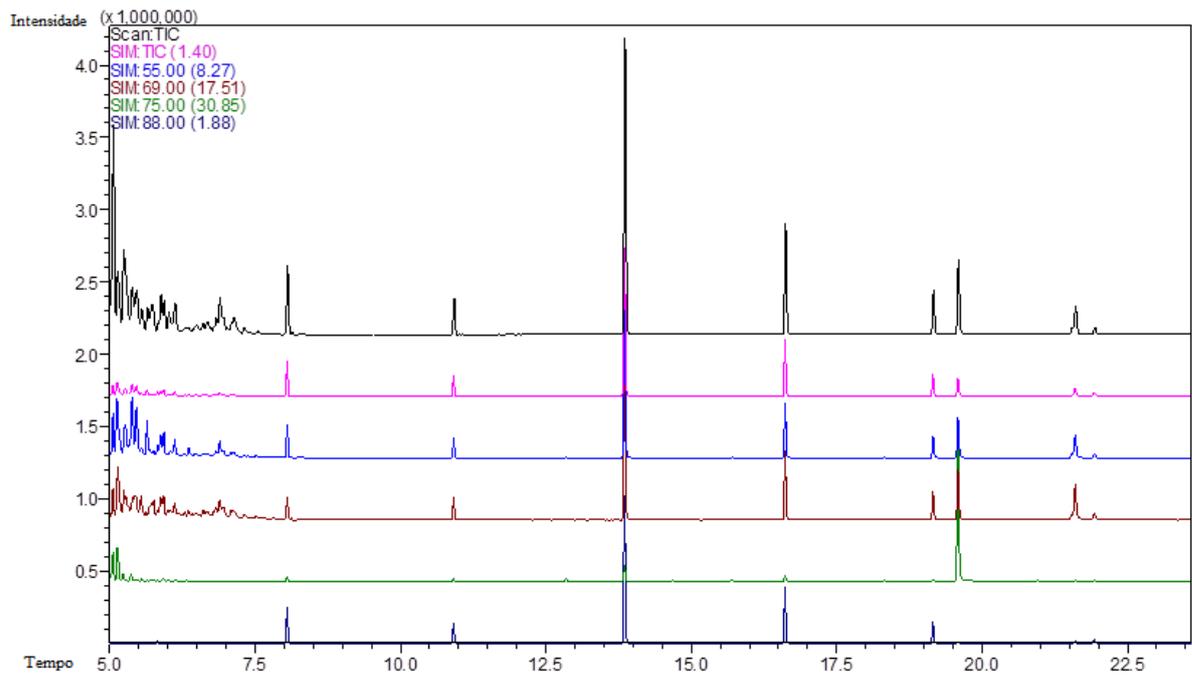


Figura A.1.2. Cromatograma em modo SIM de quantificação dos ésteres etílicos para óleo de coco bruto e etanol (1:7) após 144h de reação em batelada à 40°C utilizando o BI-LI-OTM.

ANEXO 2

Nesta sessão de anexos, serão listadas informações suplementares referente ao teste de potencial emulsificante do palmitato de cetila sintetizado utilizando o biocatalisador imobilizado aerogel modificado com líquido iônico no carregamento otimizado de lipase *Burkholderia cepacia* (BI-LI-OTM).

Tabela A.2.1. Avaliação da atividade emulsificante do Tween 40 e Triton X-100 utilizados como controle de qualidade e do palmitato de cetila frente Hexano, Oleo de coco Virgem e Bruto, sendo considerada alta quando ($A \geq 1,8$ cm), moderada ($1\text{cm} \leq A \leq 1,7$ cm) e baixa ($A < 1$ cm).

Substrato	Amostra	Altura Total (cm)	Altura Emulsionada (A) (cm)			E (%)			AE _{alo} (UE/g)		
			0,5 h	1 h	24 h	0,5 h	1 h	24 h	0,5 h	1 h	24 h
			Hexano	Tween 40	5,1	0,8	0,4	0	15,7	7,8	0
Hexano	Triton X-100	4,5	4,5	4,5	0,1	100,0	100,0	2,2	48,5	48,5	1,1
	palmitato de cetila	5,0	0,4	0,3	0,3	8,0	6,0	6,0	3,9	2,9	2,9
Óleo de coco virgem	Tween 40	5,0	5,0	5,0	3,8	100,0	100,0	76,0	48,5	48,5	36,8
	Triton X-100	6,2	6,2	6,2	3,0	100,0	100,0	48,4	48,5	48,5	23,5
	palmitato de cetila	4,7	4,1	3,5	2,5	87,2	74,5	53,2	42,3	36,1	25,8
Óleo de coco bruto	Tween 40	5,0	5,0	5,0	3,8	100,0	100,0	76,0	48,5	48,5	36,8
	Triton X-100	6,2	6,2	6,2	3,1	100,0	100,0	50,0	48,5	48,5	24,2
	palmitato de cetila	4,8	0,3	0,3	0,3	6,3	6,3	6,3	3,0	3,0	3,0

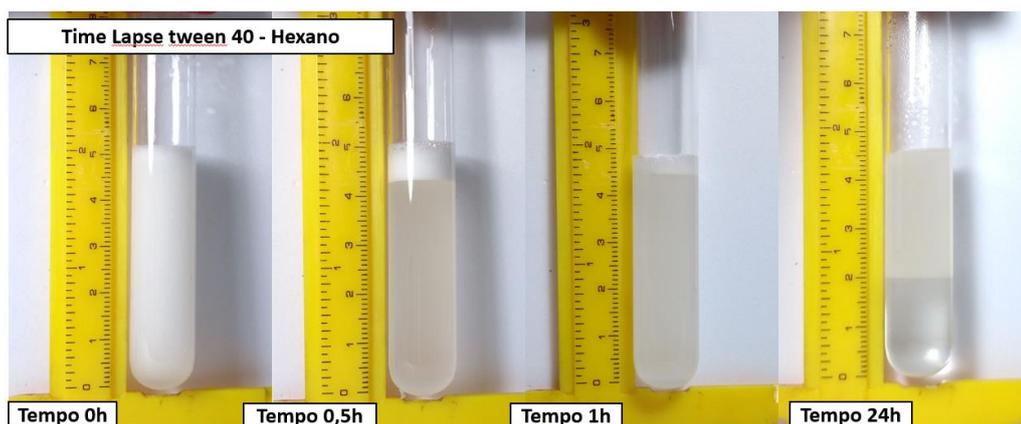


Figura A.2.1. Testes para atividade emulsificante utilizando Hexano como substrato e Tween 40 como emulsionante

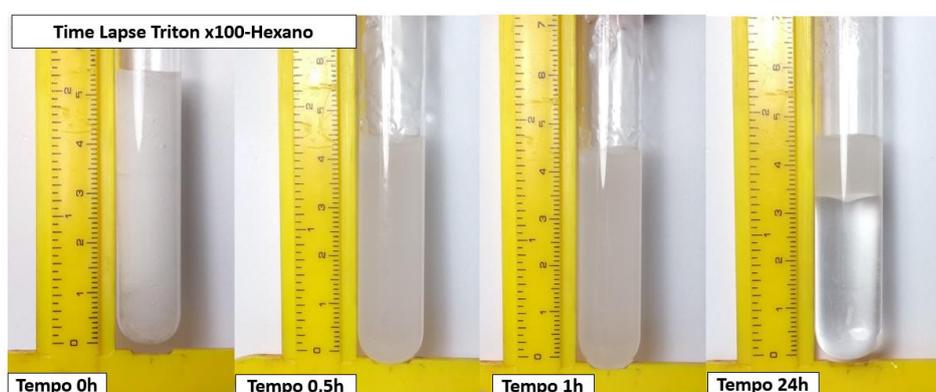


Figura A.2.2. Testes para atividade emulsificante utilizando Hexano como substrato e Triton X-100 como emulsionante.

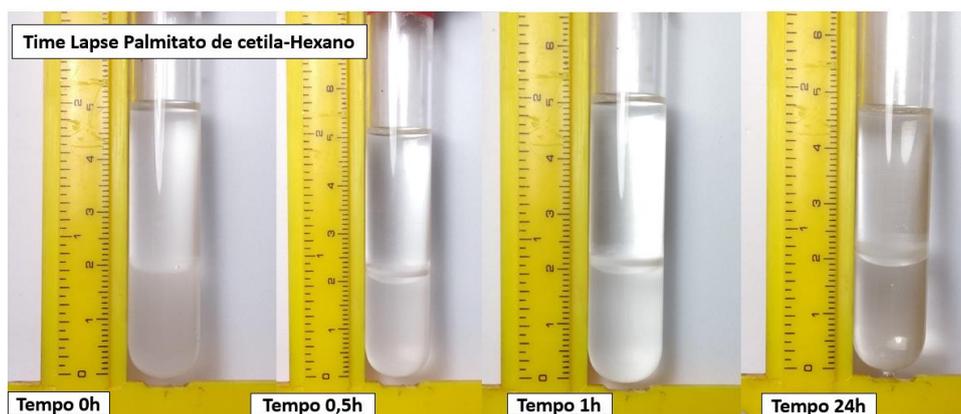


Figura A.2.3. Testes para atividade emulsificante utilizando Hexano como substrato e palmitato de cetila como emulsionante.

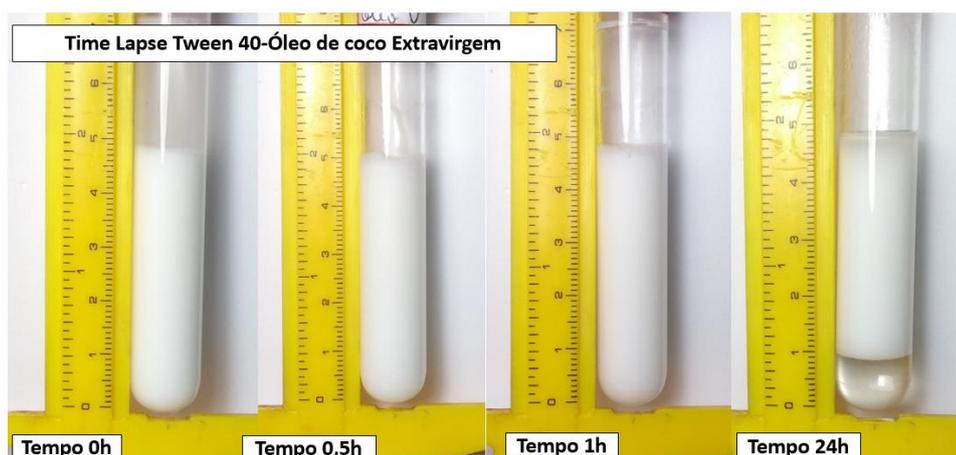


Figura A.2.4. Testes para atividade emulsificante utilizando óleo de coco virgem como substrato e Tween 40 como emulsionante.



Figura A.2.5. Testes para atividade emulsificante utilizando óleo de coco virgem como substrato e Triton X-100 como emulsionante.



Figura A.2.6. Testes para atividade emulsificante utilizando óleo de coco virgem como substrato e palmitato de cetila como emulsionante.

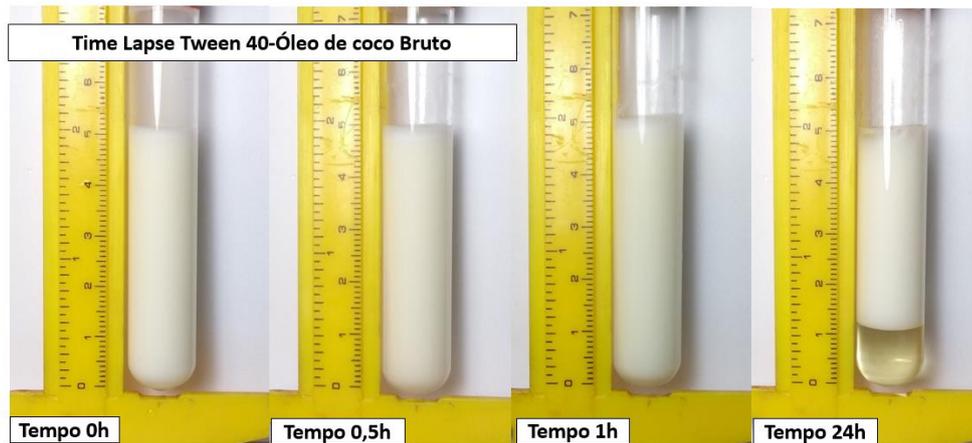


Figura A.2.7. Testes para atividade emulsificante utilizando óleo de coco bruto como substrato e Tween 40 como emulsificante.

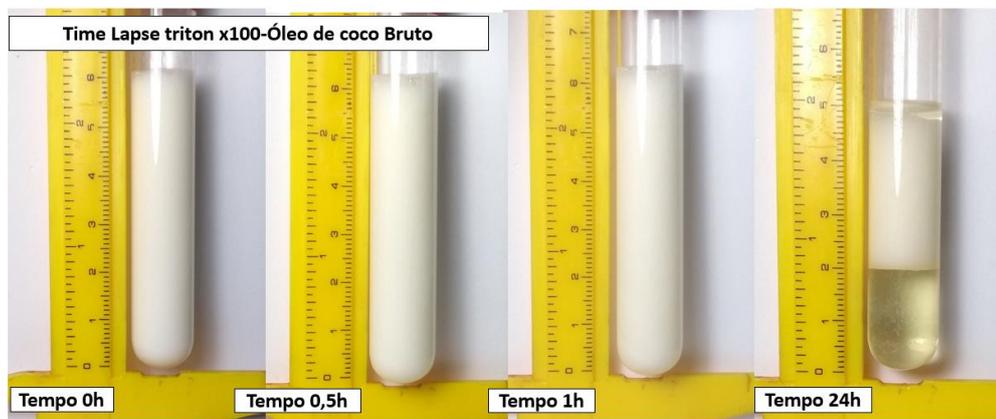


Figura A.2.8. Testes para atividade emulsificante utilizando óleo de coco bruto como substrato e Triton X-100 como emulsificante.

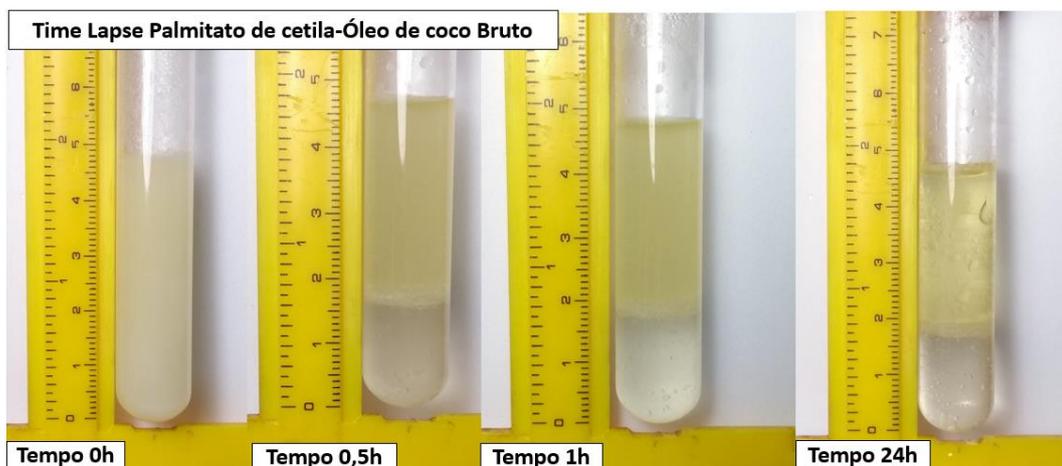


Figura A.2.9. Testes para atividade emulsificante utilizando óleo de coco bruto como substrato e palmitato de cetila como emulsificante.