

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES –URI- ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ALINE MATUELLA MOREIRA FICANHA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CAL B) PELA
TÉCNICA DE SOL-GEL**

**ERECHIM, RS – BRASIL
FEVEREIRO DE 2014**

ALINE MATUELLA MOREIRA FICANHA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CAL B) PELA
TÉCNICA DE SOL-GEL**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de concentração – Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Orientadores: Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni

**ERECHIM, RS- BRASIL
FEVEREIRO DE 2014**

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica B* (CAL B) pela técnica de sol-gel

Aline Matuella Moreira Ficanha

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago / URI –Erechim
(Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni / URI-Erechim
(Orientador)

Prof^a. Dr. Jamile Zeni / URI-Erechim

Prof^a. Dra. Luciane Maria Colla / UPF

Erechim, 26 de Fevereiro, 2014.

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Tenzin Gyatso

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida. Por ter proporcionado mais uma realização profissional e pela presença em todos os momentos dessa conquista. Pela proteção, força e sabedoria.

Ao meu marido Ricardo Ficanha, por entender acima de tudo a minha ausência nesse período, pelo incentivo, amor, paciência, compreensão e companheirismo. Por me fazer perceber que com amor, carinho e dedicação tudo é possível. Obrigada pela oportunidade de aprender tanto ao seu lado.

Aos meus pais, José e Sirlei, pelos valores morais, amor incondicional e por toda valorização que deram a minha formação e educação.

Ao meu irmão Cícero por toda troca de experiência, pelo amor, apoio e amizade.

Aos meus orientadores, Rogério Dallago e Marcelo Mignoni, por me acolherem em sua equipe de trabalho, pelo incentivo, confiança, otimismo e por todo estímulo e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A professora Jamile Zeni, por ter acompanhado esse trabalho, pelas contribuições durante os seminários e por estar sempre disponível nos momentos em que precisei.

As professoras Geciane Toniazzo e Natália Paroul pelas contribuições durante as realizações dos seminários.

A professora Luciane Maria Colla, pela disponibilidade de participar como avaliadora deste trabalho. Por ser um exemplo de profissional e pessoa a qual sempre admirei.

Com carinho aos amigos e colegas que tive a oportunidade de conhecer durante o mestrado, que diariamente estiveram comigo e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial a Ilizandra (Sandy), Juliana Zanatta e a minha bolsista Katarine.

A minha amiga, colega, vizinha Nádia Nyari, por ter aceitado ajudar nos meus primeiros passos da parte experimental desta dissertação, por ter enfrentado junto comigo todas as alegrias, tristezas, facilidades e dificuldades que esse grande desafio proporciona.

A minha colega Ludmila Noskoski, pela amizade, companheirismo, pelos momentos de descontração e principalmente, por acreditar no meu potencial e por dar oportunidade de demonstrá-lo.

A CAPES e a URI pela concessão de bolsa e apoio financeiro. E, por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

Resumo da dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CAL B) PELA TÉCNICA DE SOL-GEL

Aline Matuella Moreira Ficanha
Fevereiro/2014

Orientadores: Dr. Rogério Marcos Dallago
Dr. Marcelo Mignoni

O presente trabalho teve como objetivo imobilizar, por encapsulamento, a enzima lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) em matriz hidrofóbica obtida pela técnica de sol-gel. O tetraetilortossilicato foi empregado como precursor da sílica. Para a etapa de formação do sol-gel foram avaliados três catalisadores: um ácido (HCl), um básico (NH₄OH) e outro nucleofílico (HBr). Avaliou-se também a influência do uso do aditivo PEG 1500 na imobilização. A eficiência do processo foi avaliada considerando a atividade de esterificação dos derivados obtidos. Um planejamento experimental 2² foi proposto para verificar a influência no rendimento de imobilização das variáveis massa de enzima e massa do aditivo PEG 1500. O emprego do aditivo PEG 1500, independente da massa de enzima, proporcionou um aumento na atividade do derivado e do rendimento. O planejamento experimental demonstrou efeito negativo para a massa de enzima e positivo para o aditivo PEG 1500 sobre o rendimento da imobilização. O processo de imobilização proporcionou um aumento na estabilidade térmica, de armazenagem e operacional em relação à enzima livre. As condições de armazenamento influenciaram na estabilidade da enzima suportada. Os derivados básico e nucleofílico apresentaram melhores resultados em termos de estabilidade ao armazenamento em relação à enzima livre e imobilizada no derivado ácido. Os resultados demonstram a possibilidade de reutilizar os derivados básico e nucleofílico por até sete vezes, considerando uma atividade residual de 50 %. Além disto, foi possível observar o efeito do tipo de tratamento entre os ciclos. A lavagem com hexano proporcionou o menor número de ciclos, independente do derivado. O derivado básico e nucleofílico foram empregados na síntese do éter acetado de isoamila e apresentaram conversões de 60 e 70 %, respectivamente.

Palavras-chave: Imobilização, lipase, sol-gel, aditivo PEG 1500, esterificação.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

IMMOBILIZATION OF *Candida antarctica* B (CAL B) LIPASE BY SOL-GEL TECHNIQUE

Aline Matuella Moreira Ficanha
February/2014

Advisors: Dr. Rogério Marcos Dallago
Dr. Marcelo Mignoni

The objective of this thesis was immobilized by encapsulation the enzyme *Candida Antarctica* lipase B (CAL B) in hydrophobic matrix obtained by sol-gel technique. The tetraethylorthosilicate was used as the silica precursor. For the step of formation of sol-gel three catalysts: one acid (HCl), one basic (NH₄ OH) and the other nucleophile (HBr) were evaluated. The influence of additive PEG 1500 was checked in immobilization. The efficiency of process was evaluated considering the esterification activity of the derivatives. The experimental design 2² was proposed to investigate the influence on the yield of immobilization of variables mass the enzyme and mass of additive PEG 1500. The use of the additive PEG 1500, regardless of the mass of enzyme increase activity of the derivative. The experimental design showed negative effect for the mass of enzyme and positive for additive PEG 1500. The immobilization process provided an increase, in relation to the free enzyme, as regards the thermal stability, storage and operational. The stability of the immobilized enzyme was influenced by storage conditions. The basic and nucleophilic derivatives was presented better results in terms of storage stability compared to the free enzyme and acid derivative immobilized. The results demonstrate the possibility of reuse of derivatives, and the greater number of cycles (seven), considering a residual activity of 50 %. Furthermore, it was possible to observe the effect of type of treatment between cycles. The wash with hexane provided the fewest recycles, independent of the derivative. The basic and nucleophilic derivative was used in the synthesis of isoamyl ether acetate and showed conversions of 60 % and 70 %, respectively.

Keywords: Immobilization, lipase, sol-gel, additive PEG 1500, esterification.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Lipases.....	18
2.2.1 Aplicações de lipases em reações de catálise.....	20
2.2.1.1 Síntese de ésteres.....	21
2.2.2 Lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B	21
2.3 Imobilização enzimática.....	23
2.3.1 Imobilização de lipase	24
2.4 Métodos de imobilização	25
2.4.1 Técnica Sol-gel.....	28
2.4.1.2 Formação do sol-gel.....	30
2.4.2 Aditivos	33
2.4.2.1 Polietilenoglicol	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Enzima e produtos químicos	35
3.2 Influência do catalisador e do aditivo PEG na imobilização.....	35
3.2.1 Caracterização dos derivados imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico	36
3.2.2 Determinação da atividade de esterificação	36
3.2.3 Avaliação das propriedades do derivado imobilizado.....	37
3.2.3.1 Determinação do rendimento da imobilização	37
3.2.3.2 Estabilidade de estocagem	37
3.2.3.3 Estabilidade térmica	38
3.2.3.4 Influência da temperatura na reação de esterificação.....	38
3.2.3.5 Estabilidade operacional (reusos).....	38
3.3 Influência da massa de enzima e de aditivo peg 1500 no rendimento do derivado imobilizado.....	39
3.4 Determinação da conversão da reação para produção de ésteres aromatizantes.....	40
3.4.1 Procedimento experimental para a reação de esterificação	40
3.4.2 Determinação da conversão de aromas	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Imobilização da enzima lipase em derivados xerogel ácido, básico e nucleofílicos obtidos pela técnica de sol-gel	41

4.2 Caracterização dos derivados imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico obtidos pela técnica de sol-gel	42
4.2.1 Difração de raios X (DRX)	42
4.2.2 Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	43
4.3 Determinação da atividade de esterificação e do rendimento da imobilização da enzima lipase em suporte xerogel pela técnica sol-gel	46
4.4 Estabilidade do armazenamento dos derivados imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico.....	47
4.5 Estabilidade térmica	49
4.6 Influência da temperatura na reação de esterificação.....	51
4.7 Estabilidade operacional (reuso)	52
4.8 Avaliação da influência da massa de enzima e de aditivo peg 1500 no rendimento do derivado imobilizado.....	55
4.8.2 Planejamento de experimento para o derivado básico	55
4.8.1 Planejamento de experimento para o derivado nucleofílico.....	57
4.9 Determinação da conversão da reação para produção de ésteres aromatizantes.....	60
5 CONCLUSÕES.....	62
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações da enzima lipase na indústria de alimentos e química.....	20
Tabela 2 - Variáveis reais e codificadas testadas no Planejamento 2^2 com repetição no ponto central.....	39
Tabela 3 - Massa dos xerogéis ácido, básico e nucleofílico após secagem completa.....	41
Tabela 4 - Características dos xerogéis imobilizados em meio ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.....	45
Tabela 5 - Rendimento da imobilização da enzima lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CAL B) em xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.....	46
Tabela 6 - Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 com três pontos centrais e os resultados obtidos da imobilização da enzima lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CAL B) pela técnica de sol-gel.....	55
Tabela 7 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento do Planejamento Fatorial 2^2 para o rendimento de imobilização em função da massa de enzima e de PEG.....	56
Tabela 8 - Análise de variância dos resultados obtidos através dos experimentos do Planejamento Fatorial 2^2	56
Tabela 9 - Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 com três pontos centrais e os resultados obtidos da imobilização da enzima lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CAL B) pela técnica de sol-gel.....	58
Tabela 10 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento do Planejamento Fatorial 2^2 para o rendimento de imobilização em função da massa de enzima e de PEG.....	58
Tabela 11 - Análise de variância dos resultados obtidos através dos experimentos do Planejamento Fatorial 2^2	59
Tabela 12 - Conversões de acetato de isoamila com o uso dos derivados básico e nucleofílico.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações catalisadas pela enzima lipase.....	19
Figura 2 - Sítio ativo da <i>Candida antarctica</i> B (CAL B).....	22
Figura 3 - Métodos de imobilização de enzima.	26
Figura 4 - Esquema da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.	28
Figura 5 - Hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do grupo silanol.	29
Figura 6 - A condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente a formação do sol e após o gel.	29
Figura 7 - Difractogramas de raios X dos derivados imobilizados na presença da enzima CAL B: (a) suporte ácido, (b) suporte básico e (c) suporte nucleofílico.	42
Figura 8 - Análise textural de adsorção/dessorção de N ₂ para os derivados xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.....	44
Figura 9 - Atividade de esterificação residual da lipase imobilizada e armazenada em temperatura ambiente.....	47
Figura 10 - Atividade de esterificação residual da lipase imobilizada e armazenada em refrigeração.	48
Figura 11 - Atividade residual em diferentes temperaturas de contato durante 60 minutos.	50
Figura 12 - Atividade de esterificação em diferentes temperaturas na reação de síntese.	51
Figura 13 - Atividade residual do reuso contínuo.	53
Figura 14 - Atividade residual do reuso contínuo lavado com hexano.	53
Figura 15 - Atividade residual do reuso a cada 24 horas.	54
Figura 16 - Superfície de resposta e curva de contorno das variáveis no rendimento do derivado básico nos experimentos do Planejamento Fatorial 2 ²	57
Figura 17 - Superfície de resposta e curva de contorno das variáveis no rendimento do derivado nucleofílico nos experimentos do Planejamento Fatorial 2 ²	59

LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E UNIDADES

%: Porcentagem;

°C: Graus Celsius;

µL: Microlitros;

AA: Atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização (U/g);

AI: Atividade do suporte imobilizado (U/g de suporte);

AT: Atividade total no derivado imobilizado (U/g);

CAL B: Lipase de *Candida antarctica* do tipo B;

d: Dias;

DRX: Difracao de Raio X;

h: Horas;

K: Graus Kelvin;

M: molar;

mg: miligrama;

mL: Mililitros;

N₂: Gás Nitrogênio;

PEG: Polietilenoglicol;

pH: Potencial de hidrogênio inico;

PS: Peso do suporte imobilizado (g);

R²: Coeficiente de correlação;

RI: Rendimento do imobilizado (%);

rpm: Rotação por minuto;

TEOS: Tetraetilortosilicato;

U: Unidade de atividade;

1 INTRODUÇÃO

As enzimas possuem grande interesse na aplicação industrial por serem catalisadores biológicos naturais utilizados em diversos tipos de reações. Da mesma forma que catalisadores químicos, promovem o aumento da velocidade das reações, porém, as enzimas como biocatalisadores não necessitam de tratamento de resíduos, são altamente específicas aos seus substratos proporcionando produtos seletivos, além do produto da reação poder ser considerado como natural.

Dentre as enzimas, a lipase vem sendo estudada como um catalisador alternativo para diferentes reações químicas, tais como hidrólise de ácidos graxos, a esterificação, interesterificação e transesterificação. Porém, seu uso na sua forma livre torna-se limitado devido ao elevado custo, baixa estabilidade e impossibilidade de reutilização.

Desta forma, a técnica de imobilização apresenta-se como uma alternativa para contornar tais limitações, possibilitando uma maior estabilidade à enzima, facilidade operacional na separação dos produtos, além de poder ser reutilizada mais que uma vez.

A imobilização pode ocorrer por encapsulamento, por interações químicas ou físicas a um determinado suporte. Diferentes materiais e processos são descritos na literatura com esta finalidade. No processo, além das questões econômicas, devem ser consideradas as questões operacionais, como as condições experimentais empregadas na síntese, à facilidade de produção, o tempo envolvido no processo e quantidade de enzima incorporada.

Dentre os diferentes métodos destaca-se a imobilização em matrizes obtidas pela técnica sol-gel. O processo para formação da matriz hidrofóbica para imobilização possui diversas variáveis que determinam as características finais dos materiais, tais como o grupo silanol precursor da sílica, o tempo de hidrólise e condensação e a homogeneidade do produto. Além disso, alguns aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita sua utilização para imobilizar enzimas.

Neste contexto, para a imobilização da lipase *Candida Antartctica B*, optou-se pelo emprego do método sol-gel, particularmente pela sua simplicidade, onde a enzima a ser imobilizada é adicionada *in situ* durante a formação da matriz, proporcionando a incorporação total da enzima oferecida ao suporte, além de o processo ocorrer em condições brandas de temperatura (ambiente) e em uma ampla região de pH.

Cabe ainda destacar que, em função de sua composição (apresenta sílica em sua estrutura) o suporte gerado tende a apresentar elevada estabilidade térmica e química.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi imobilizar, por encapsulamento, a enzima lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) em matriz hidrofóbica obtida pela técnica de sol-gel.

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a influência da adição da enzima e aditivo no processo de imobilização;
- Caracterizar as propriedades dos derivados imobilizados;
- Avaliar a influencia da enzima e do aditivo no rendimento de imobilização;
- Realizar síntese de aromas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O trabalho apresentará uma revisão da literatura no que diz respeito a definições sobre a enzima lipase, suas aplicações em reações de catálise, dentre elas a síntese de ésteres; processos de imobilização enzimática, com foco na técnica sol-gel.

2.1 LIPASES

As enzimas são caracterizadas como catalisadores biológicos ou biocatalisadores, em sistemas “in vivo” e “in vitro”, de natureza proteica, altamente específica e com grande poder catalítico (WISEMAN, 1995). Podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal, obtidas por meio de processos fermentativos e por trituração de tecidos vegetais e animais (BACHA et al., 2005; JOSÉ e PRADO, 2005).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas cresce gradativamente, especialmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não-convencionais, o que ampliou consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (SVENDSEN et al., 1997).

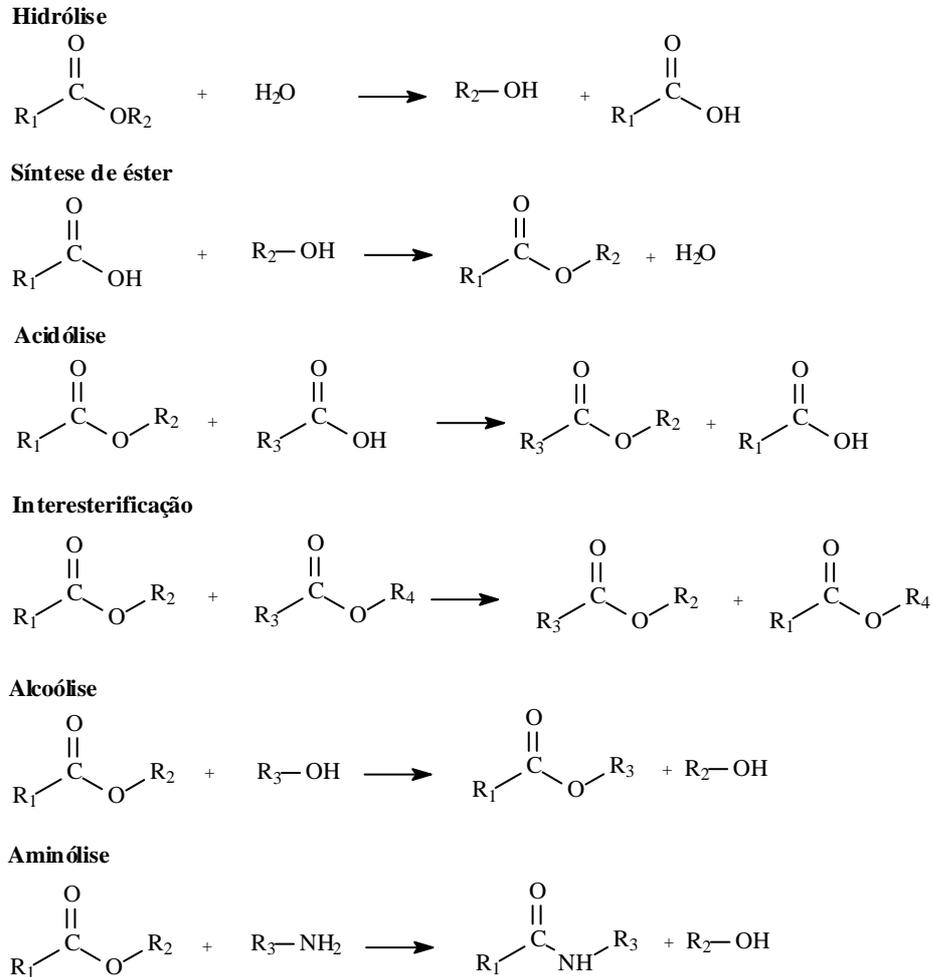
O uso de enzimas como catalisadores de processos industriais está atualmente dividido em três grandes segmentos: enzimas técnicas, destinadas principalmente aos setores de produtos de limpeza, têxtil, de couros, de álcool como combustível e de papel e celulose; enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para ração animal. As principais enzimas industriais são: protease, amilase, celulasas, xilanases, fitase e as lipases (BON et al., 2008).

A função natural das lipases (triacilglicerol hidrolases E.C. 3.1.1.3) é a hidrólise de triglicerídeos. Contudo, elas podem ser usadas in vitro para catalisar muitas reações diferentes (Figura 1). Industrialmente, são usadas na modificação de óleos e gorduras, síntese de ácidos graxos como cosméticos ou surfactantes, e na produção de compostos intermediários para síntese orgânica (por exemplo: na resolução de misturas racêmicas) (PALOMO et al., 2002).

Amplamente distribuídas na natureza, as lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, as leveduras *Tulopis* sp e *Candida* sp e as bactérias *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases provenientes de

micro-organismos são preferíveis às de fontes animais e plantas, devido ao elevado custo de isolamento vinculado a estas fontes (CASTRO et al., 2004; DUMITRIU et al., 2003).

Figura 1 - Reações catalisadas pela enzima lipase



Fonte: Villeneuve et al., 2000

As características da lipase variam em função da sua origem. As lipases podem apresentar massa molecular que varia de 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas que variam desde a ambiente até 70 °C. As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente e apresentam, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 °C e 40 °C. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de pH entre 3,6 e 7,6 e a maioria delas possui pI (ponto isoelétrico) em pH entre 4 e 5. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (KIRK e CHRISTENSEN, 2002; SHARMA et al., 2001).

Estas enzimas são biocatalisadores mais versáteis e mais eficientes empregados, devido sua alta atividade e estabilidade em condições micro aquosa. Além da versatilidade, as lipases são biodegradáveis, régio-específicas e apresentam baixa toxicidade o que permite a obtenção de produtos com elevado grau de pureza sem causar fortes impactos ambientais (JAEGER e EGGERT, 2002).

2.2.1 Aplicações de lipases em reações de catálise

As lipases ocupam uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais, principalmente nos setores químicos e alimentícios. As principais aplicações são apresentadas nas Tabelas 1.

Tabela 1 - Aplicações da enzima lipase na indústria de alimentos e química.

Indústria de alimentos	Efeito	Produto
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhora o sabor/qualidade, aumenta o tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhora o aroma e acelera a fermentação, por remoção dos lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saquê, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhora a qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de Óleos	Transesterificação de óleos naturais; Hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas (substitui a manteiga de cacau)
Indústria química	Efeito	Produto
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de óleo e gordura	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes.

Fontes: Castro et al. (2004); Sharma et al. (2001)

As lipases catalisam uma série de reações diferentes. Além de catalisar a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação) que depende dos reagentes inicialmente empregados (BALCÃO et al., 1996).

2.2.1.1 Síntese de ésteres

Os ésteres de ácidos graxos são encontrados na indústria em produtos como aromas, medicamentos, sabões, perfumes e cosméticos, na produção de biocombustíveis, entre outros. A síntese de ésteres baseia-se na esterificação de ácidos graxos com álcool na presença de catalisadores inorgânicos a elevadas temperaturas (>100 °C).

Estes processos demandam grandes quantidades de energia, além de serem lentos e não seletivos. Com o crescente aumento da busca por ésteres para o emprego em aditivos e aromas na indústria, torna-se necessário encontrar novas formas mais efetiva para extração de aromas (ABBAS e COMEAU, 2003; KUMAR et al., 2005).

Neste contexto, o emprego de enzimas como biocatalisadores permitem a obtenção de produtos de melhor qualidade, em temperaturas relativamente baixas e sendo rotuladas como naturais pela indústria (KISS et al., 2004; WELSH et al., 2006).

As lipases podem promover diversos tipos de reações em condições brandas e seletivas, destacando-se a produção de ésteres. Exemplos de tais reações são observados em sínteses empregando ésteres de ácido acético, oleico, butírico e cáprico e álcoois como etanol, butanol e isopentanol (JIN et al., 2012; LARIOS et al., 2004).

Dente eles, o oleato de etila (síntese de ácido oleico e etanol), é um éster usado como biodiesel, aditivo de combustível diesel e nas indústrias de cosméticos e de alimentos (BLOOMER et al., 1992; FORESTI e FERREIRA, 2005; YAHYA et al., 1998).

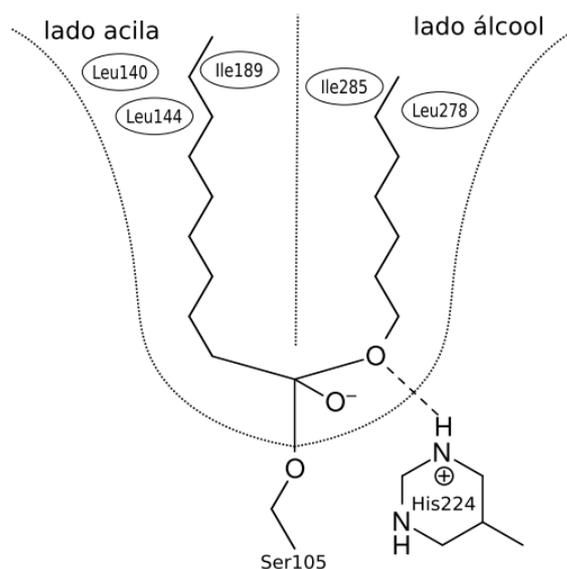
2.2.2 Lipase de *Candida antarctica* do tipo B

A lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL B) é constituída de 317 resíduos de aminoácidos com estrutura globular e dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å, tem peso molecular de 33 kDa e ponto isoelétrico (PI) em pH de 6,0 (UPPENBERG et al., 1994).

A cavidade de ligação para o substrato ("sítio ativo") consiste em uma cavidade para ligações acila e outra porção para ligações com álcoois. Em contraste com a maioria das lipases, que apresentam um impedimento maior ("tampa") na entrada do sítio ativo, na CAL B essa tampa é reduzida e não prejudica a entrada de substratos e saída de produto (UPPENBERG et al., 1994).

No caso específico da CAL B, a cavidade ligante do substrato é elíptica (Figura 2) com o formato de um funil. As paredes desse canal são bastante hidrofóbicas. Contudo, na parte superior do sítio ativo há apenas uma pequena área hidrofóbica, o que favorece a não formação de camadas sobrepostas de moléculas por esta enzima (TRODLER e PLEISS, 2008; UPPENBERG et al., 1994).

Figura 2 - Sítio ativo da *Candida antarctica* B (CAL B).



Fonte: TRODLER e PLEISS, 2008.

A CAL B é um biocatalisador com uso bem diversificado, tem sido estudada para potenciais aplicações na indústria alimentícia, de detergente, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e óleo-química (HASAN et al., 2006). Na forma imobilizada opera em uma ampla faixa de condições experimentais, com vários trabalhos que demonstram alta eficiência na catálise de várias reações em meio orgânico, tanto em escala de laboratório quanto comercial (COSTA e AMORIM, 1999).

As principais aplicações industriais da CAL B na forma livre ou imobilizada são: na produção de compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica (STRAATHOF et al., 2002); alimentos e fármacos (CASTRO et al., 2004); produção de ésteres usados na indústria

de aromas (BRÍGIDA et al., 2008; LOZANO et al., 2002); síntese de oleato de cetila que possui importantes aplicações em indústrias de cosméticos, biodiesel (SILVA et al., 2012); síntese de lactato de butila (éster utilizado em indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica por possuir propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes) (PIROZZI e GRECO, 2004); síntese de ésteres de vitaminas (a fim de torná-las solúveis em óleo para adição em produtos alimentícios) (MAUGARD e LEGOY, 2000); e outras como esterificação de açúcares e glicidol (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2003; PALOMO et al., 2005).

Estas aplicações são possíveis devido à sua ampla gama de especificidade para substratos, alta atividade em várias reações sob condições brandas, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica além da atuação em ampla faixa de pH (RODRIGUES et al., 2008; DENG et al., 2011).

As aplicações citadas são frequentemente limitadas devido à estabilidade, à dificuldade de recuperação e reuso do biocatalisador. Desta forma, a imobilização de enzimas oferece algumas vantagens operacionais em relação a enzimas solúveis (ADRIANO et al., 2005).

2.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas solúveis, devido a sua natureza proteica, são menos estáveis que os catalisadores químicos e não podem ser usadas em condições severas, pela possível desnaturação e conseqüente perda progressiva da atividade funcional. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo pode provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação (CHULALAKNASANUKUL et al., 1990; ZAKS e KLIBANOV, 1985).

O custo elevado das enzimas solúveis é outro limitador de sua aplicação para finalidades comerciais. O emprego de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil (LOZANO et al., 2004 e SVENDSEN et al., 1997).

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e, frequente, inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização (CARVALHO et al., 2006).

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas, biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (SOARES et al., 2002).

O uso de células imobilizadas tem sido considerado como uma alternativa para aumentar a produtividade global de fermentações, tradicionalmente realizadas com células em suspensão, uma vez que permite o trabalho com elevadas concentrações celulares no reator (CARVALHO et al., 2006).

De acordo com as condições de imobilização e dos suportes empregados, a enzima pode apresentar diferentes propriedades finais que podem mudar sua estabilidade frente a pH e/ou temperatura. No desenvolvimento de um biocatalisador imobilizado, as características mais desejáveis são elevadas estabilidade operacional e eficiência catalítica. A estabilidade operacional é uma avaliação da perda de atividade do biocatalisador. Nesta avaliação, bateladas consecutivas da reação de interesse são realizadas, a qual depende de uma série de fatores, tais como: desprendimento da enzima do suporte, obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários e perda de suporte por atrito ou dissolução (SOARES et al., 2001).

Neste sentido as principais vantagens obtidas no processo de imobilização são: *i*) o aumento das estabilidades térmica e operacional, protegendo o sítio ativo da enzima da inativação; *ii*) a reutilização em outras etapas do processo; *iii*) a redução de custo operacional e *iv*) a fácil separação e recuperação da enzima do meio reacional, reduzindo custo e etapas de purificação do produto (DALLA-VECCHIA et al., 2004; PAIVA et al., 2000; VILLENEUVE et al., 2000).

2.3.1 Imobilização de lipase

As lipases imobilizadas tornam-se cada vez mais úteis para os processamentos biotecnológicos. A imobilização assegura o reuso das enzimas, pois permite a remoção da enzima do meio reacional, minimiza o custo de separação dos produtos e desta forma reduz o inconveniente econômico associado ao seu uso. A imobilização também fornece a

flexibilidade operacional devido à melhora das estabilidades térmica e química das enzimas através da estabilização da estrutura terciária da proteína (BALCÃO et al., 1996; VILLENEUVE, 2000).

As propriedades catalíticas de lipases são fortemente influenciadas pelas características do suporte. A escolha do suporte para imobilização de enzimas depende de várias características que são importantes na sua aplicação em processos industriais, tais como: resistência mecânica e microbiana, estabilidade térmica, funcionalidade química, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, facilidade de regeneração, morfologia (superfície de contato e porosidade) e custo (VILLENEUVE, 2000). É desejável que o suporte possua características compatíveis com as moléculas da enzima para prevenir a formação de ligações não específicas (TARDIOLI et al., 2003).

Em geral, os suportes utilizados nos processos de imobilização devem possuir uma grande área superficial (superfície macroscópica e área das paredes internas dos poros) para obtenção de alta capacidade catalítica e distribuição de poros de forma homogênea, com tamanho de poro adequado para o acesso da enzima e aos substratos e produtos. A enzima imobilizada no interior dos poros está protegida contra a formação de agregados no processo de imobilização e contra a inativação ocasionada por agentes externos (turbulência do meio, temperatura, força iônica, solvente), que permite obtenção de derivados com maior estabilidade operacional (MATEO et al., 2007).

O suporte deve ser estável em uma ampla faixa de pH, a solução salina, bem como aos reagentes utilizados no processo de ativação, e às condições reacionais. Deve ser fisicamente estável, com certa rigidez mecânica e, principalmente baixo custo de preparação para aumentar a viabilidade de aplicação industrial. Dificilmente encontra-se um suporte que atenda a todos estes requisitos, deste modo, a sua escolha deve levar em conta a finalidade (CASTRO et al., 2004).

2.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

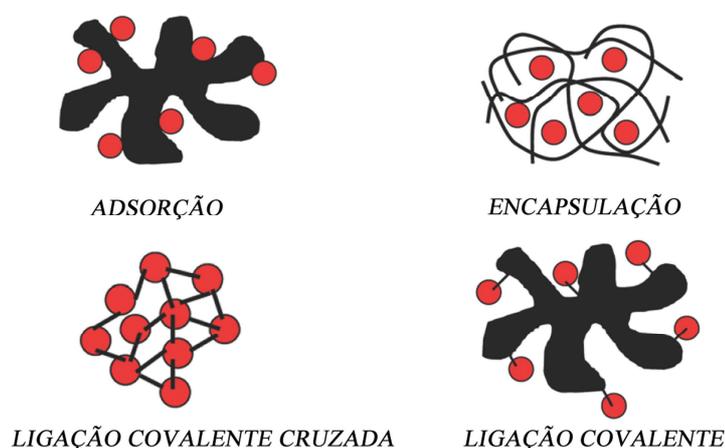
Para que o emprego de enzimas imobilizadas se torne um processo economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte empregado, assim como o método de imobilização. Muitas técnicas de imobilização têm sido reportadas como o uso dos suportes de natureza orgânica e inorgânica com diferentes características (DUMITRIU et al., 2003).

Entre os métodos de imobilização existentes (Figura 3), inclui-se adsorção, ligação covalente a suportes sólidos, ligação covalente cruzada (cross-linking) e encapsulação de

enzimas em matrizes poliméricas inorgânicas/orgânicas que proporciona novas possibilidades de utilização no campo da ciência dos materiais (AVNIR et al., 1994; ANVIR, 1995; AVNIR et al., 2006; CAO et al., 2009; CHAUBEY et al., 2009).

A adsorção física da enzima é o modo mais simples e rápido de imobilização. Baseia-se em interações físicas entre a enzima e a superfície da matriz. Uma atividade muito próxima da obtida na enzima livre é observada, e as principais vantagens da adsorção são o baixo custo e a facilidade de imobilização. Devido as ligações serem facilmente desfeitas, a temperatura, o pH e a força iônica, são parâmetros que devem ser severamente controlados, sendo este o principal problema relacionado a este tipo de interação (FABER, 1997; FERRER et al., 2000).

Figura 3 - Métodos de imobilização de enzima.



Fonte: Adaptado de Adlercreutz (2013).

Os métodos que empregam encapsulação são baseados no confinamento da enzima em um suporte físico, este suporte deve reter a enzima, apresentar porosidade controlada, de maneira a permitir a livre difusão do substrato e dos produtos da reação através da mesma. Numerosos suportes têm sido utilizados, como por exemplo: sílica, poliuretano, náilon, nitrato de celulose, acetato de celulose, resinas, colágeno e policarbonatos. Como principais desvantagens pode-se citar: *i*) aos fenômenos de transferência de massa do substrato; *ii*) aos produtos da reação e, *iii*) ao crescimento de micro-organismos na superfície do suporte (SOARES et al., 2000).

A técnica de imobilização por ligação covalente consiste na retenção da enzima na superfície do suporte por ligações entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do suporte. A desvantagem está na perda de parte da atividade enzimática, por conta das alterações nas conformações dos sítios ativos da enzima (ROCHA et al., 1998).

A ligação covalente cruzada (*cross-linking*) é baseada na formação de um sistema reticulado das moléculas da enzima, que forma uma rede rígida. Este processo oferece a vantagem de uma ligação mais sólida, porém, pode induzir a formação de barreiras de difusão que resulta no aumento do tempo de resposta do biossensor. O glutaraldeído e o álcool polivinílico são exemplos de agentes de ligação cruzada (FERRER et al., 2000).

Além do tipo de imobilização, vários parâmetros importantes devem ser analisados para a escolha do suporte como: a estabilidade química e física, o caráter hidrofóbico/hidrofílico, a capacidade de ligação com a enzima. No entanto, alguns acontecimentos devem ser evitados ou prevenidos durante a imobilização, tais como (SILVA et al., 2009):

- a) *Perda de atividade da enzima*: A perda de atividade está relacionada com a imobilização da mesma, pois invariavelmente ocorre uma inativação parcial da enzima devido ao envolvimento de interações fracas (forças de Van der Waals) e/ou fortes (ligação covalente) entre a estrutura da enzima e o suporte. Pode também ocorrer alterações de orientação e acesso do substrato ao sítio ativo, o que reduz a atividade ou ainda leva à redução aparente da especificidade ao substrato (BON et al., 2008). A redução aparente da atividade também pode ser resultado das restrições difusionais, pelo fato da enzima estar fortemente ligada ao suporte e sua mobilidade ficar restringida, limitando o acesso do substrato ao sítio ativo, que afeta a cinética da reação pela redução da velocidade de reação ou ainda pela alteração do pH no microambiente da enzima (FOGLER, 2002);
- b) *Diferenças na característica física do biocatalisador e do fluido*: As enzimas imobilizadas normalmente são utilizadas quando o substrato é solúvel, uma vez que as enzimas estejam retidas no interior de matrizes porosas, os poros devem facilitar o livre acesso do substrato ao mesmo tempo em que retêm a molécula de enzima no seu interior (FOGLER, 2002);
- c) *Perda na estabilidade do biocatalisador*: As propriedades físicas do suporte devem ser mantidas durante o tempo de meia vida estimado, assim, o custo da imobilização deve ser compensado pela meia vida do biocatalisador. Normalmente os substratos utilizados nas reações enzimáticas contêm substâncias em suspensão, por exemplo, lipídeos podem ser adsorvidos ao suporte e bloquear os poros, diminuindo a acessibilidade do substrato à enzima, promovendo uma redução aparente do tempo de meia-vida da enzima imobilizada (FOGLER, 2002).

Desta forma, para que o processo de imobilização seja efetivo, o suporte deve permitir o acesso da enzima aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

2.4.1 Técnica Sol-gel

Uma das principais rotas de obtenção de materiais híbridos orgânico-inorgânicos é o processo sol-gel. O processo de sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois se trata de uma rota de síntese de materiais onde em um determinado momento ocorre a transição do sistema sol para um sistema gel (HIRATSUKA et al., 1995).

O termo sol é empregado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido, enquanto o termo gel pode ser definido como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios.

Desse modo, os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias (Figura 4 a), somente poderá ocorrer pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão. Por outro lado, os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização. Neste caso a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (Figura 4 b) (HIRATSUKA et al., 1995).

Figura 4 - Esquema da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.



Fonte: HIRATSUKA et al., 1995.

A reação de polimerização de matriz sol-gel pode ser dividida em duas etapas: a hidrólise e a condensação, demonstradas nas Figuras 5 e 6.

Figura 5 - Hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do grupo silanol.

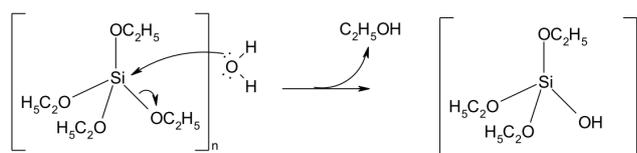
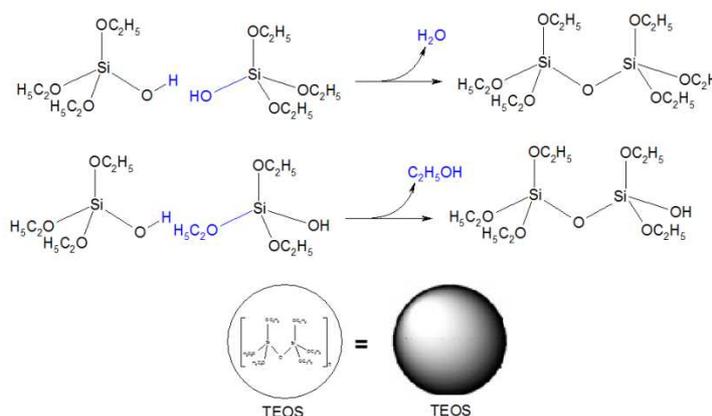


Figura 6 - A condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente a formação do sol e após o gel.



Fonte: Boaventura, 2013

As reações químicas que ocorrem durante a formação do sol, do gel e do xerogel, influenciam fortemente a composição e as propriedades do produto final (ALFAYA e KUBOTA, 2002). A produção de uma matriz sol-gel pode ser iniciada pela hidrólise parcial dos precursores (silicatos de alquila ou alcoxisilanos) resultando em um oligômero que pode ser transesterificado com o glicerol. O oligômero presente é totalmente hidrolisado formando-se uma dispersão coloidal (sol), à qual é adicionada uma solução contendo o biocatalisador, desta forma, inicia-se o processo de poli condensação, que resulta na formação de uma fase distinta (o aerogel quando seco em altas pressões ou o xerogel quando seco em temperatura ambiente) contendo o biocatalisador (enzimas). A matriz é envelhecida, resultando no final do processo, nano ou micro matrizes (CABRAL et al., 2003).

A facilidade para transformar um sol em um gel depende em grande parte do tipo de partículas coloidais em suspensão. Essa transição ocorre muito facilmente com soluções poliméricas e com sílica (SEIDEL et al., 2007).

2.4.1.1 Imobilização pela técnica de sol-gel

A imobilização de enzimas no interior de matrizes produzidas pelo processo de sol-gel é uma técnica muito vantajosa, pois preserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação,

ao contrário do que ocorre, na maioria das vezes, com filmes finos ou membranas empregadas como suporte (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

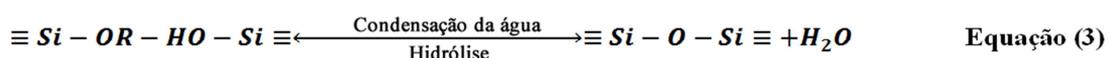
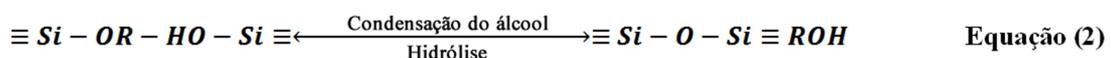
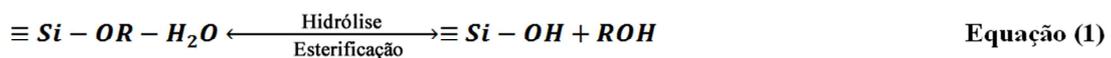
Um grande número de biomoléculas pode ser imobilizado em materiais sol-gel por ligação covalente ou por encapsulação, mediante a adição da biomolécula ao sistema antes da geleificação, uma vez que o processo pode ser conduzido em condições brandas de temperatura (normalmente ambiente) e pH (≈ 7), diminuindo assim a probabilidade de ocasionar inativação das mesmas durante a etapa de imobilização (SEIDEL et al., 2007).

A técnica sol-gel de encapsulação tem provado ser um modo particularmente simples e eficaz para imobilizar enzimas purificadas, células inteiras, anticorpos e outras proteínas. Pode melhorar a sua estabilidade térmica e, em longo prazo, a estabilidade operacional e de armazenagem (FURUKAWA e KAWAKAMI, 1998; HENCH e WEST, 1990; KIM et al., 2006; MATEO et al., 2007; REETZ et al., 1996; SHELDON, 2007).

Embora a enzima imobilizada pela técnica de sol-gel geralmente exiba uma melhor atividade e estabilidade comparada com as enzimas livres, existem algumas desvantagens no processo de imobilização por esta técnica (REETZ et al., 1996). Pode ocorrer o encolhimento do gel durante a condensação e secagem da matriz, o que pode causar a desnaturação das enzimas, a liberação de álcoois durante a hidrólise de um alcóxido de silício, a diminuição da taxa de difusão das moléculas de substrato até enzima dentro da matriz de sol-gel, dificultando a atividade catalítica da enzima imobilizada, principalmente em materiais com um diâmetro de poro menor de 20°A (GUISAN, 2006).

2.4.1.2 Formação do sol-gel

Do mecanismo de sol-gel apenas a primeira etapa, a hidrólise, é bem conhecida, pois as reações de condensação começam antes das reações de hidrólise terminar, tornando o mecanismo muito complexo, envolvendo muitas reações de hidrólise e condensação ao mesmo tempo. Estas reações em geral são apresentadas nas Equações 1, 2 e 3 (CHAUDHURY et al., 2007).



Na reação de hidrólise apresentada na Equação (1), a água substitui os grupos alcóxido (OR), gerando grupos hidroxilo (OH). Subsequente às reações de condensação (Equações 2 e 3), envolvendo os grupos silanol (Si-OH) produzem as ligações siloxano (Si-O-Si), com água ou álcool como subprodutos. Geralmente a condensação começa antes de a hidrólise estar completa. No entanto, parâmetros como o pH, a razão molar H₂O/Si (R) e catalisador pode forçar a conclusão da hidrólise antes da condensação começar. Além disso, devido à água e alcóxidos serem imiscíveis, um solvente mútuo, por exemplo, o álcool, deve ser utilizado. Na presença deste agente de homogeneização, a hidrólise do álcool é facilitada devido à miscibilidade do alcóxido com a água. Conforme aumenta o número de ligações siloxano, as moléculas individuais são ligadas em conjunto e agregadas no sol (CHAUDHURY et al., 2007).

Estas etapas devem ser catalisadas por ácidos ou bases, uma vez que a cinética de oxidação é fortemente dependente do pH. A natureza do catalisador, ácido ou básico, influencia diretamente na cinética de reação, assim como, na estrutura final do gel (FONSECA e AIROLDI, 2003; HENCH e WEST, 1990; SANCHEZ et al., 1988).

Se a hidrólise for catalisada por ácido, ocorre uma reação eletrofílica, e a velocidade da condensação será maior que a de hidrólise, isto leva à formação de géis compostos de cadeias poliméricas lineares entrelaçadas, as quais, após secagem formam uma matriz densa de baixo volume de poro. Sob condições básicas, a condensação ocorre preferencialmente entre oligômeros altamente ramificados, os quais levam à formação de géis particulados que, após secagem, produzem materiais menos densos, com alta porosidade (BRINKER e SCHERER, 1990; BUCKLEY e GREENBLATT, 1994; JOSÉ e PRADO, 2005).

Acima do pH 7, a polimerização é extremamente rápida, o que leva a formação de partículas com diâmetro de 2 nm em poucos minutos. Na ausência de eletrólitos as partículas coloidais apresentam elevada densidade de cargas superficiais, impedindo a agregação devido a repulsão eletrostática. Esses fenômenos permitem controlar a cinética da transformação sol-gel e a estrutura das espécies condensadas (BRINKER e SCHERER, 1990; JOSÉ e PRADO, 2005).

Se a hidrólise for catalisada por base, a reação deve se processar através de uma substituição nucleofílica, e a velocidade de hidrólise será maior que a velocidade de condensação, conduzindo a formação de cadeias mais ramificadas no início do processo (JOSÉ e PRADO, 2005).

Após a secagem do gel, parte dos solventes (água e álcool) fica retido, enquanto a principal parte é expulsa em função do encolhimento de rede e devido a condensação, e um

xerogel é formado (CHAUDHURY et al., 2007). Uma compreensão básica da cinética e das reações envolvidas no processo de sol-gel é de primordial importância na preparação de materiais com características controladas (BRINKER e SCHERER, 1990; HENCH e WEST, 1990).

A adição de solventes e condições reacionais podem promover certas reações de esterificação e de despolimerização inversas as Equações (1), (2) e (3). Géis molhados (com maior teor de solvente) apresentam durante envelhecimento/secagem um minimização na possibilidade de fissuração (CHAUDHURY et al., 2007; HENCH e WEST, 1990).

As propriedades físicas (área superficial específica, tamanho médio dos poros e sua distribuição) de um gel seco (o xerogel) dependem fortemente dos parâmetros utilizados no processo do sol-gel. A razão molar água:silano, a natureza e a concentração do catalisador e o tipo do precursor alcóxido são parâmetros específicos que afetam diretamente as velocidades relativas das reações de hidrólise e condensação, as quais, por sua vez, ditam as propriedades do material final. Em geral, preparações com baixos valores de pH e teor de água produzem materiais densos com tamanho médio de poros pequenos, enquanto preparações com valores altos de pH e teores de água produzem materiais mais porosos (BRINKER e SCHERER, 1990; BUCKLEY e GREENBLATT, 1994; HENCH e WEST, 1990).

As condições de síntese normalmente empregadas no processo sol-gel (precursores metalo-orgânicos, solventes orgânicos e baixas temperaturas de processamento) permitem a introdução de moléculas orgânicas "frágeis" dentro da rede inorgânica. Tais moléculas orgânicas podem melhorar as características da matriz, como por exemplo, modificar as propriedades mecânicas, facilitar o processamento de fibras e filmes, possibilitar a moldagem precisa de peças para óptica integrada, possibilitar o controle de porosidade e o ajuste do balanço hidrofóbico/hidrofílico (ZOPPI e NUNES, 1997).

Os alcóxidos metálicos são mais populares, pois reagem facilmente com água. Os alcóxidos de metais mais amplamente utilizados são os alcoxissilanos, tais como tetrametoxissilano (TMOS) e tetraetoxissilano (TEOS). O TEOS e o TMOS são os precursores mais comumente utilizados para sintetizar silicatos. Suas hidrólises em soluções aquosas, associados às reações de policondensação adicionais, podem causar uma formação de partículas de sol, conduzindo à auto-organização em uma rede tridimensional porosa (BRINKER e SCHERER, 1990; CHAUDHURY et al., 2007).

As características e as propriedades de uma rede de sol-gel, especialmente inorgânico, estão relacionados com fatores que afetam a taxa de hidrólise e de condensação, tal como a proporção molar água:precursor (R), o tipo de solvente, a natureza do catalisador e sua

concentração, pH, temperatura, tempo, e as condições de envelhecimento e secagem (CHAUDHURY et al., 2007).

2.4.2 Aditivos

A utilização de aditivos para estabilizar enzimas dentro da matriz sol-gel como açúcares, aminoácidos, polióis e agentes tensioativos têm sido utilizados para aumentar a atividade e estabilidade de várias enzimas imobilizadas por alteração da hidratação da enzima ou redução do encolhimento do gel. Eles também podem afetar as propriedades físicas do gel através da participação em reações de condensação com grupos silanol livres (REETZ et al., 2003; SOARES et al., 2006).

As moléculas de água, que se encontram ao redor da molécula de enzima, exercem um papel importante na estabilidade e conformação estrutural devido, principalmente, a sua influência nas interações hidrofóbicas, além das forças de Van der Waals, pontes salinas e pontes de hidrogênio (YAMANE et al., 1990; FABER, 1997).

Desta forma, pequenas variações no meio reacional, como temperatura, pH, força iônica, entre outras, podem induzir modificações estruturais na enzima, em alguns casos conduzindo a desativação da mesma (FABER, 1997). Essa desnaturação é decorrente da exposição da parte hidrofóbica da enzima em água, o que promove um aumento do nível de hidratação mesma. Assim, não é surpresa que a manipulação da natureza do meio e da quantidade de água ao redor da enzima tenha um profundo efeito sobre a estabilidade (YAMANE et al., 1990).

A remoção da água da superfície da enzima conduz a uma reorganização das moléculas de água devido ao incremento do número de ligações intermoleculares por pontes de hidrogênio, o que contribui para o aumento da rigidez da mesma (FABER, 1997). Este efeito pode ser alterado pelo uso de aditivos hidrofílicos, como os polióis e polissacarídeos, que agem como reguladores da estrutura da enzima em meio aquoso (GONÇALVES et al., 1999; YAMANE et al., 1990).

De acordo com Bosley (1991) apud Soares et al. (2003), caseína, gelatina, albumina de ovo e albumina bovina são aditivos eficientes para imobilização de lipases em vários suportes. Reetz et al. (1996), recomendam também o uso de outros tipos de aditivos macromoleculares, como, por exemplo, álcool polivinílico (PVA) e polietilenoglicol (PEG).

Cabe salientar que os aditivos não ativam a enzima, em vez disto, apresentam um efeito estabilizante que previne a desativação da enzima quando de sua interação com o suporte (REETZ et al., 1996; ROCHA et al., 1998; VILLENEUVE et al., 2000).

2.4.2.1 Polietilenoglicol

O uso de polietilenoglicol (PEG) como aditivo na imobilização enzimática concede melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, o que permite um melhor contato entre a interface água/óleo, e favorece uma condição necessária para a expressão da atividade hidrolítica da lipase imobilizada (SOARES et al., 2000).

Na imobilização de lipases, o uso de aditivos macromoleculares mostram efeitos estabilizantes na atividade enzimática por meio do revestimento da interface, impedindo uma mudança de sua estrutura proteica (ROCHA et al., 1998; VILLENEUVE et al., 2000). A presença de PEG durante o processo de imobilização de lipase, provavelmente, afeta o nível de hidratação da enzima, modificando a hidrofiliabilidade do microambiente (ROCHA et al., 1998).

Soares et al. (2001; 2002; 2003), avaliaram diferentes tipos de aditivos considerando a atividade hidrolítica, bem como a estabilidade operacional de derivados imobilizados de lipase de *Candida rugosa* em sílica de porosidade controlada. Entre os aditivos testados, o polietilenoglicol (MM 1500) proporcionou um considerável aumento da atividade hidrolítica, além de reduzir a desativação da enzima e a utilização do PEG com menor massa molar aumenta significativamente o rendimento na recuperação da atividade enzimática da lipase de *Candida rugosa*, atingindo valores de 60 % (SOARES et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ENZIMA E PRODUTOS QUÍMICOS

A enzima utilizada na imobilização foi a lipase comercial de *Candida antarctica* (CAL B) (Novozyme); O polietilenoglicol (PEG) (1500, Merck) foi usado como agente de estabilização (aditivo); Para a imobilização pela técnica de sol-gel foi utilizado como precursor da sílica o tetraetilortosilicato/tetraetoxisilano (TEOS) (Aldrich), hidróxido amônia (mínimo 28 %) (Quimex), ácido clorídrico (mínimo 36 %) (Vetec), ácido bromídrico (Vetec). Para determinação da atividade de esterificação foram utilizados: álcool etílico (mínimo 99 %) (Merck), acetona (Merck), ácido oleico (Synth), hidróxido de sódio (Synth) e água destilada.

3.2 INFLUÊNCIA DO CATALISADOR E DO ADITIVO PEG NA IMOBILIZAÇÃO

A lipase de *Candida antarctica* B foi imobilizada por encapsulamento em uma matriz hidrofóbica obtida pela técnica de sol-gel. A metodologia empregada foi adaptada da descrita por Soares et al. (2006). Inicialmente, 5 mL de TEOS foram dissolvidos em 5 mL de etanol absoluto. Após a dissolução, adicionou-se 1,61 mL de água destilada e três gotas do catalisador, em uma proporção molar de água e TEOS de 4:1. Foram testados três diferentes catalisadores para os suportes (ácido, básico e nucleofílico). O meio ácido foi catalisado com ácido clorídrico, o meio básico com hidróxido de amônia e o meio nucleofílico com ácido bromídrico.

Posteriormente, os sistemas reacionais foram submetidos a uma etapa de agitação, em agitador orbital (shaker), a 40 °C, 180 rpm, por um período de 90 minutos. Passado este período, fez-se a adição de 1 mL da solução enzimática (160 mg.mL⁻¹). Nas amostras para o teste do uso do aditivo foram adicionados 1 mL de uma solução do aditivo PEG 1500 na concentração de 5 mg.mL⁻¹. Nas bateladas conduzidas em meio ácido e nucleofílico foram adicionados 1,75 mL da solução hidrolisante (0,25 mL de hidróxido de amônia dissolvidos em 1,50 mL de etanol). Posteriormente, os sistemas reacionais foram mantidos em condições estáticas por 24 horas para completar a condensação química. Após as 24 horas, o suporte foi condicionado em dessecador a vácuo por um novo período de 24 horas para completa secagem e evaporação da água.

O gel seco incorporado com a enzima, denominado de derivado imobilizado, foi pesado, triturado e armazenado para os posteriores testes reacionais.

3.2.1 Caracterização dos derivados imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico

Os suportes foram caracterizados por difração de raios X (DRX) (Rigaku, Miniflex II, Ka- 1,58 Cu) e análise textural de adsorção/dessorção de N₂ (Quantachrome, Nova 2200e). As áreas específicas dos materiais sintetizados (derivados xerogel ácido, básico e nucleofílico, com e sem aditivo) foram determinadas com o uso do método BET (BRUNAUER, EMMETT, TELLER, 1938). O volume e o diâmetro médio dos poros foram calculados pelo método de BJH (RAMOS et al., 1998). Para a análise da área superficial, previamente, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico a 60 °C, sob vácuo, para eliminar toda a água existente no interior dos poros do sólido. A análise foi realizada sob temperatura constante a 77 K (-196 °C).

3.2.2 Determinação da atividade de esterificação

As atividades de esterificação foram determinadas na solução enzimática (enzima livre) e nos derivados imobilizados.

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação de síntese de oleato de etila utilizando ácido oleico e álcool etílico na razão molar de 1:1 (mistura padrão), conforme descrito por Ferraz et al. (2012). A reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada ou livre (aproximadamente 0,1 g) em 5 mL da mistura padrão. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados a 40 °C, em agitador orbital a 160 rpm, durante 40 minutos. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação. A quantidade de ácido oleico consumido foi determinado por titulação com NaOH 0,05 M até o meio atingir pH 11. Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da mistura padrão e 15 mL da solução de acetona-etanol.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, calculada pela Equação 4.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_c}$$

Equação 4

Onde:

AE : Atividade de esterificação (U/g);

V_a : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL);

V_b : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL);

M : Molaridade da solução de NaOH;

V_f : Volume final de meio reacional (mL);

t : Tempo (minutos);

m : Massa da solução enzimática ou do suporte utilizado (g);

V_c : Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

3.2.3 Avaliação das propriedades do derivado imobilizado

A fim de avaliar as propriedades da enzima lipase imobilizada (derivado) foram realizadas a determinação do rendimento de imobilização, o estudo referente as estabilidades de estocagem e térmica, influência da temperatura na reação de esterificação e estabilidade operacional de reuso.

3.2.3.1 Determinação do rendimento da imobilização

O rendimento do derivado imobilizado foi calculado a partir da Equação 5:

$$R(\%) = \frac{AT}{AA} \times 100$$

Equação 5

Onde:

AT: Atividade de esterificação total do derivado;

AA: Atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização.

3.2.3.2 Estabilidade de estocagem

A estabilidade de estocagem dos derivados imobilizados e da enzima livre foram realizadas a temperatura ambiente ($\approx 20-25$ °C) e em refrigeração em geladeira (≈ 4 °C). A

atividade foi acompanhada semanalmente, por um período de 200 dias. Os resultados foram apresentados em porcentagem da atividade residual, calculadas pela Equação 6:

$$AR(\%) = \frac{Atividade^i}{Atividade^0} \times 100$$

Equação 6

Onde:

Atividadeⁿ: Atividade de esterificação no tempo “i”

Atividade⁰: Atividade de esterificação no tempo inicial

3.2.3.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica do derivado imobilizado e da enzima livre foram realizadas pela reação de esterificação em amostras incubadas em estufa nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C durante 1 hora. Após 1 hora de incubação foram realizadas as medidas das atividade de esterificação a 40 °C. Os resultados de atividade foram comparados com os da atividade inicial.

3.2.3.4 Influência da temperatura na reação de esterificação

Considerando que a temperatura do meio reacional também pode influenciar na atividade da enzima, foram conduzidos ensaios de esterificação empregando temperaturas reacionais de 30 °C, 40 °C e 50 °C por 40 minutos, 160 rpm em uma razão molar de 1:1 (álcool: ácido) na enzima livre e no derivado imobilizado.

3.2.3.5 Estabilidade operacional (reusos)

Devido à falta de uma metodologia definida na literatura, a estabilidade operacional do reuso foi realizada de 3 formas distintas. Estes procedimentos foram realizados no final de cada ciclo de reação, no qual, o produto (fase líquida) foi removido com uma pipeta e foi mantido a fase sólida (derivado imobilizado). As reações foram repetidas até o derivado chegar a uma atividade residual maior ou igual a 50 % da atividade inicial.

i) modo contínuo: após os 40 minutos de reação, o meio reacional foi removido do sistema, fez-se nova adição da solução padrão (ácido oleico e etanol), levou-se a amostra para nova reação.

ii) *contínuo lavado com hexano*: após a remoção do meio reacional, o derivado imobilizado foi submetido a uma etapa de lavagem com hexano (2 vezes com 2 mL de hexano). Após, o meio foi centrifugado a 5000 rpm. Retirou-se o hexano sobrenadante, deixou-se o derivado em estufa a 40 °C por aproximadamente 1 hora para a evaporação do solvente residual. Posteriormente, as mesmas quantidades de solução padrão foram adicionadas ao derivado para a próxima reação;

iii) *reuso a cada 24 horas*: as reações foram conduzidas a cada 24 horas, mantendo o imobilizado armazenado em geladeira, no próprio meio reacional já esterificado. No início de cada ciclo fez-se a substituição do meio pela mistura reacional padrão.

3.3 INFLUÊNCIA DA MASSA DE ENZIMA E DE ADITIVO PEG 1500 NO RENDIMENTO DO DERIVADO IMOBILIZADO

Diversos trabalhos descrevem um melhoramento significativo na atividade e estabilidade de enzimas imobilizadas, quando o procedimento de imobilização é realizado em presença de aditivos (GONÇALVES et al., 1999; SOARES et al., 2003; ROCHA et al; 1998).

Desta forma, para avaliar a influência da massa de enzima e de aditivo PEG 1500 em relação ao rendimento do suporte imobilizado da enzima lipase foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com triplicata do ponto central. As variáveis (massa de enzima e massa do aditivo PEG 1500) foram avaliadas para os derivados imobilizados catalisados em meio ácido e nucleofílico. A Tabela 2 apresenta os valores reais e codificados testados no planejamento.

Tabela 2 - Variáveis reais e codificadas testadas no Planejamento 2^2 com repetição no ponto central.

Experimento	X ₁	X ₂
1	-1 (0,05)	-1 (0)
2	+1 (0,25)	-1 (0)
3	-1 (0,05)	+1 (0,05)
4	+1 (0,25)	+1 (0,05)
5	0 (0,15)	0 (0,025)
6	0 (0,15)	0 (0,025)
7	0 (0,15)	0 (0,025)

X₁: massa de enzima (g); X₂: massa de aditivo (g);

Os resultados para o rendimento de imobilização obtidos nos planejamentos foram analisados através de Análise de Variância e Metodologia de Superfície de Resposta utilizando-se o módulo *Experimental Design do Software Statistica 6.0*.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO DA REAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES AROMATIZANTES

3.4.1 Procedimento experimental para a reação de esterificação

Esta etapa foi realizada em 25 mL de uma mistura reacional de ácido acético e álcool isoamílico. A razão molar empregada foi de 3:1. Após dissolução completa dos reagentes, a enzima imobilizada juntamente com a peneira molecular 4A foram adicionadas aos substratos e conduzidas à reação.

O experimento foi realizado em agitador orbital (shaker), com agitação constante de 150 rpm e temperatura de 30 °C. O término reação deu-se após 6 horas, onde posteriormente o biocatalisador foi removido do sistema reacional por filtração, com papel filtro, sendo a fase líquida encaminhada para análise cromatográfica.

3.4.2 Determinação da conversão de aromas

A quantificação do acetato de isoamila foi determinado por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010. A análise foi realizada utilizando coluna capilar RTX-WAX restek (30m x 250 µm i.d.), 0,25 µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40 °C (5 minutos); 40-180 °C (10 minutos); 180 °C (5 minutos), temperatura do injetor 250 °C, detector a 275 °C, modo de injeção split, razão de split 50:1, gás de arraste H₂ (56 KPa), volume injetado 0,4 µL de amostra diluída em diclorometano (1:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução na área do sinal do agente limitante, ou seja, o álcool, em relação ao branco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE EM DERIVADOS XEROGEL ÁCIDO, BÁSICO E NUCLEOFÍLICOS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE SOL-GEL

A Tabela 3 apresenta o peso (g) dos derivados imobilizados xerogel ácido, básico e nucleofílico, com e sem a presença de aditivo PEG 1500.

Tabela 3 - Massa dos xerogéis ácido, básico e nucleofílico após secagem completa.

Xerogel Imobilizado	Média da massa do Suporte (g) \pm Desvio Padrão
Ácido	2,04 \pm 0,09
Ácido com aditivo	2,35 \pm 0,16
Básico	1,17 \pm 0,12
Básico com aditivo	1,36 \pm 0,13
Nucleofílico	1,93 \pm 0,08
Nucleofílico com aditivo	2,45 \pm 0,31

As massas dos derivados imobilizados variaram entre 1,17 a 2,45 g. A principal diferença foi observada para os derivados conduzidos em meio básico, os quais apresentaram uma massa aproximadamente 50 % inferior aos demais derivados. Também, observa-se que as formulações conduzidas empregando o PEG, independente do catalisador, apresentaram uma massa de derivado um pouco superior em relação aos ensaios conduzidos sem a adição do PEG.

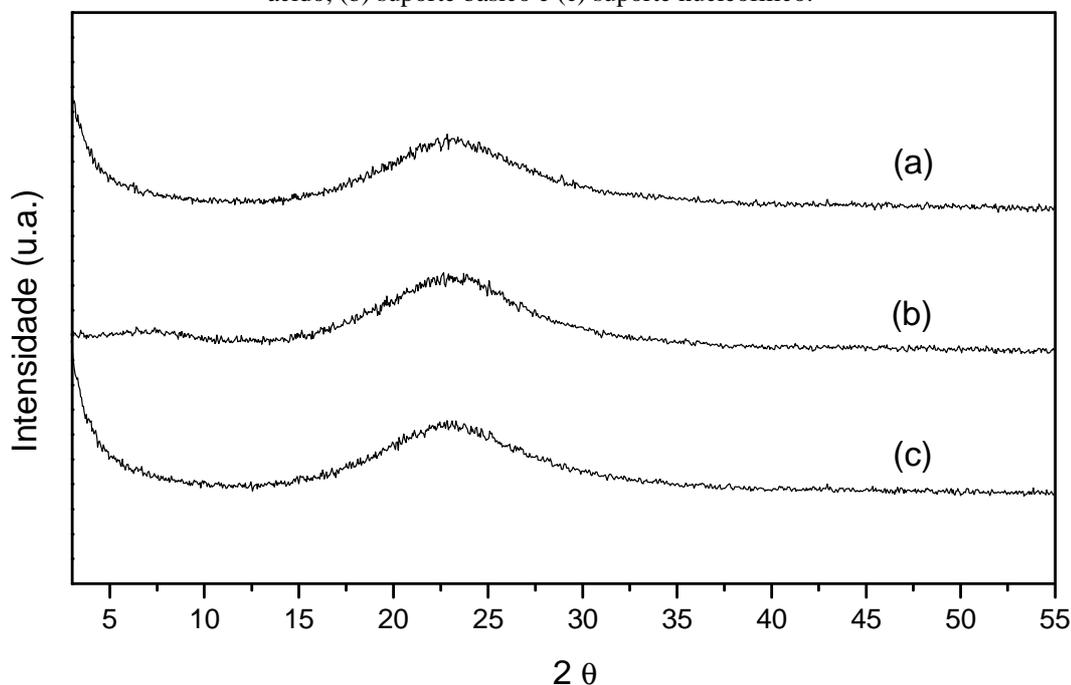
Esta tendência nos valores observados para as massas está vinculado ao pH em que é conduzida a síntese, o qual é influenciado pelo tipo de catalisador empregado. Na hidrólise catalisada pelo ácido (HCl) e pelo nucleófilo (HBr), ambos de caráter ácido, devido a reação eletrolítica, a velocidade da condensação é maior que a de hidrólise, o que leva à formação de géis que após a secagem formam uma matriz densa, de baixo volume de poro, dificultando a eliminação do solvente do derivado e, conseqüentemente, gerando maior massa final. Ao contrário, sob condições básicas, a condensação ocorre preferencialmente entre oligômeros altamente ramificados, conduzindo à formação de géis particulados que, após secagem, produzem materiais menos densos, com alta porosidade (BRINKER, 1988; BRINKER e SCHERER, 1990; BUCKLEY e GREENBLATT, 1994; JOSÉ e PRADO, 2005), ou seja, um material com propriedades facilitadoras da eliminação do solvente da estrutura dos derivados na etapa de secagem, proporcionando assim uma menor massa do derivado final.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS IMOBILIZADOS EM XEROGEL ÁCIDO, BÁSICO E NUCLEOFÍLICO OBTIDOS PELA TÉCNICA DE SOL-GEL

4.2.1 Difração de raios X (DRX)

A Figura 7 apresenta as difratogramas de raios X para os derivados ácido, básico e nucleofílico na presença da enzima lipase de *Candida antarctica* B obtidos pela técnica de sol-gel.

Figura 7 - Difratogramas de raios X dos derivados immobilizados na presença da enzima CAL B: (a) suporte ácido, (b) suporte básico e (c) suporte nucleofílico.



De acordo com a Figura 7, os suportes obtidos na presença da enzima CAL B não apresentaram picos característicos de materiais cristalinos, e sim, halos na região compreendida entre $15 - 30^\circ$ (2θ), os quais são característicos de materiais sem ordenação cristalina, ou seja, de materiais amorfos.

A estrutura amorfa do derivado foi descrito por Hench et al. (1992), no qual relatam que as reações de hidrólise e condensação do monômero de silício em presença de um catalisador ácido ou básico atuam como agente de ligação cruzada com a formação da estrutura amorfa SiO_2 , na qual o reticulado tridimensional é formado ao redor da enzima.

4.2.2 Isotermas de adsorção e dessorção de N₂

A caracterização da porosidade de matrizes hidrofóbicas e de biocatalisadores imobilizados é uma questão complexa quanto à porosidade total, o tamanho dos poros e a distribuição de tamanho dos poros. Os métodos baseados na adsorção de gás, são as mais convenientes para o estudo das propriedades porosas de materiais sólidos, através de medições volumétricas das quantidades de gás adsorvido (SOUZA et al., 2012).

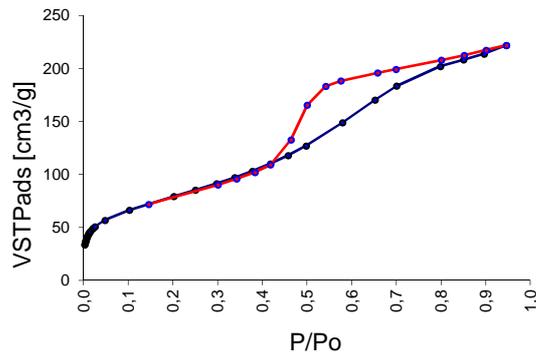
As isotermas de adsorção-dessorção de N₂, área superficial específica, volume de poros específico (V_p) e diâmetro (dp) das matrizes hidrofóbicas e biocatalisadores imobilizados foram determinados a partir de medições de adsorção-dessorção de nitrogênio, que é um método utilizado para a caracterização de materiais microporosos e mesoporosos. A análise textural mostra os resultados em relação à área de superfície específica (método BET), volume de poros e diâmetro médio dos poros para as matrizes de sol-gel e os seus derivados (SOUZA et al., 2012).

A Figura 8 apresenta as análises texturais realizadas para os derivados ácido, básico e nucleofílico obtidos com e sem o uso do aditivo PEG 1500 sintetizados pela técnica de sol-gel. Dados de literatura mostram que o volume médio dos poros e da área específica sofrem uma influência quando utilizado o aditivo PEG 1500 (SOUZA et al., 2012).

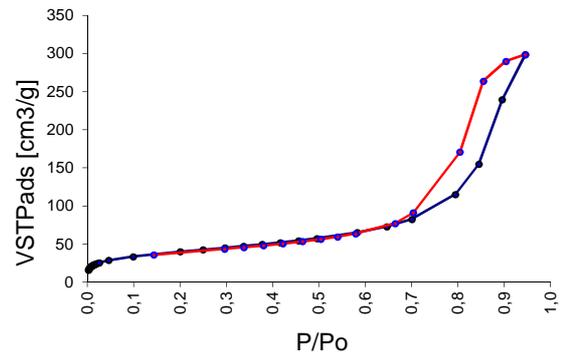
De acordo com Figura 8 os xerogéis imobilizados ácido e nucleofílico, independente da presença ou não de aditivos, apresentaram isotermas do tipo IV, que são tipicamente exibida pelos sólidos mesoporosos. Para os xerogéis básicos, com e sem o uso do aditivo, apresentaram isoterma do tipo II, características de adsorventes não porosos ou macro porosos (GREGG e SING, 1982).

Para os derivados obtidos, as isotermas apresentam caminhos diferenciados quando comparados à adsorção com a dessorção. Este fenômeno é conhecido por histerese. Pode-se observar que para os xerogéis ácido e nucleofílico, com e sem o uso de aditivo, as histereses são do tipo H2 e para o xerogel básico, com e sem a presença de aditivo, a histerese é do tipo H3. O tipo H2 está associado com uma estrutura mais complexa, no qual a distribuição do tamanho de poro e a forma não estão bem definidas. O tipo H3 não exhibe qualquer adsorção limitante em altas pressões relativas. Esta é uma evidência clara de que os adsorventes não possuem estruturas com mesoporosidade bem definida (GUAN-SAJONZ et al., 1997).

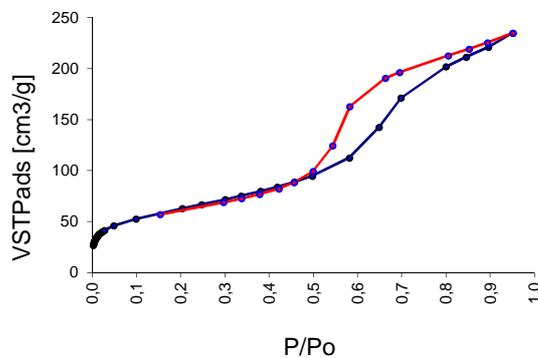
Figura 8 - Análise textural de adsorção/dessorção de N_2 para os derivados xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.



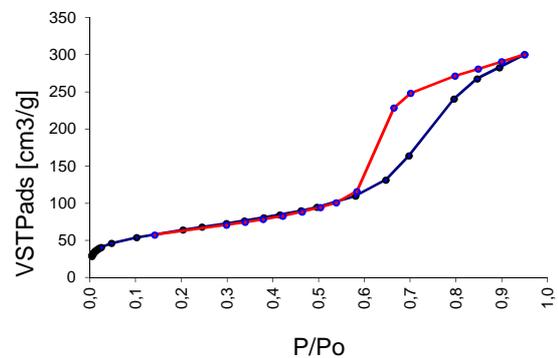
Derivado imobilizado nucleofílico



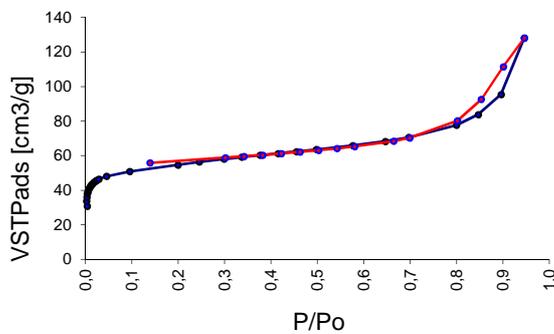
Derivado imobilizado nucleofílico com PEG



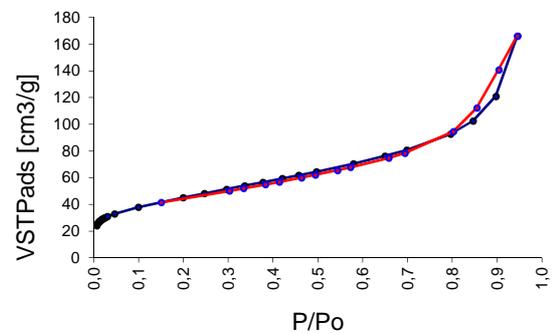
Derivado imobilizado ácido



Derivado imobilizado ácido com PEG



Derivado imobilizado básico



Derivado imobilizado básico com PEG

Na imobilização de uma enzima, a morfologia do poro é fundamental, pois o poro deve ser suficientemente grande para permitir a acomodação da enzima e o livre acesso do substrato, mas quanto maior o poro menor a área superficial do suporte e, conseqüentemente, menor o número de sítios disponíveis para a ligação da enzima (MESSING, 1975).

Souza et al. (2012), apresentaram isoterma tipo IV para a sílica pura e para o derivado imobilizado ácido com e sem o uso de Aliquat como aditivo, classificando o material como mesoporoso. Os resultados observados para a sílica pura e derivado sem aditivo para adsorção-dessorção de concorrer com os das isotérmicas com loops de histerese H2, o que

caracteriza os materiais mesoporosos. No entanto, nas amostras contendo o aditivo Aliquat, o volume adsorvido foi maior do que em sílica pura. Para os derivados imobilizados, as isotermas foram do tipo isotérmicas IV com ciclos de histerese H4.

A Tabela 4 apresenta as áreas específicas, os volumes médio dos poros dos derivados imobilizados (xerogel) em meio ácido, básico e nucleofílico com e sem a presença de aditivo PEG 1500.

Tabela 4 - Características dos xerogéis imobilizados em meio ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.

Xerogel	Área específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volume médio dos poros ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
Ácido	218	49,98
Ácido com PEG	222	51,12
Básico	204	46,93
Básico com PEG	162	37,14
Nucleofílico	284	65,22
Nucleofílico com PEG	141	32,30

É possível observar na Tabela 4 que para os suportes sintetizados via catálise ácida, a área específica, assim como o volume médio dos poros são similares em relação a presença ou não do aditivo PEG. Para os demais derivados (básico e nucleofílico) observa-se uma redução da área específica (entre 20 e 50 %) para o derivado sintetizada com PEG em relação ao sem PEG. Esta diminuição da área relacionada a presença do PEG pode estar relacionada ao fato de o mesmo estar obstruindo poros. Um percentual de redução similar foi observado em relação ao volume médio dos poros.

Souza et al. (2012), utilizando líquidos iônicos como aditivos, obtiveram sílicas com área superficial de $278 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Com o aumento a concentração de aditivo nas amostras imobilizadas ocorreu uma modificação da estrutura porosa e os valores da área específica e volume de poros diminuíram.

Esta modificação estrutural causada pela adição de aditivos também foi relatada por Zhou (2005) que relacionou a modificação à formação de pontes de hidrogênio entre o ânions dos aditivos e os grupos silanol de sílica. Vila Real et al. (2011), utilizaram aditivos na imobilização de α -Rhamnosidase and β -glucosidase em matrizes sol-gel e relataram que a adição de líquidos iônicos no processo sol-gel desempenhou um papel importante na formação de matrizes mesoporosas.

Contrariamente, Souza et al. (2010), relataram que a adição de Aliquat 336 (um sal quaternário) como aditivo durante o processo de imobilização pela técnica de sol-gel da lipase

de *Bacillus* sp. ITP-001 modificou a estrutura porosa dos derivados imobilizados, tais como um aumento do tamanho dos poros, da área específica e do volume dos poros. Na literatura, é também relatado que o uso de aditivos na imobilização, pode reduzir a lixiviação da enzima utilizada em reatores diferentes (HARA et al., 2008).

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO E DO RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPASE EM SUPORTE XEROGEL PELA TÉCNICA SOL-GEL

A Tabela 5 apresenta a massa de enzima e a atividade de esterificação teórica adicionada na imobilização, a massa do derivado obtido, a atividade do derivado por grama, a atividade de esterificação total do derivado e os rendimentos obtidos da imobilização de xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.

Tabela 5 - Rendimento da imobilização da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) em xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.

Xerogel	Enzima Adicionada		Enzima imobilizada			
	ME (g)	AA (U/g)	PS (g)	AE (U/g)	AT (U)	R (%)
Ácido	1	779,19	2,16	197,05	425,63	54,62
Ácido com aditivo	1	779,19	2,54	209,80	532,89	68,39
Básico	1	779,19	1,17	177,00	207,09	26,58
Básico com aditivo	1	779,19	1,48	378,78	560,59	71,95
Nucleofílico	1	779,19	2,03	148,46	301,37	38,68
Nucleofílico com aditivo	1	779,19	2,76	260,63	719,34	92,32

ME: massa de enzima; AA: atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização; PS: peso seco do derivado; AE: atividade de esterificação por grama do derivado; AT: atividade total no derivado; R: rendimento do derivado.

De acordo com a Tabela 5 todos os ensaios apresentaram um aumento na massa do derivado e na atividade de esterificação com a adição do aditivo PEG 1500 e, conseqüentemente, no rendimento e na atividade total obtida. O xerogel nucleofílico com aditivo apresentou atividade de esterificação de 719,34 U/g e 92 % de rendimento, dentre os ensaios, foi o que apresentou os melhores resultados.

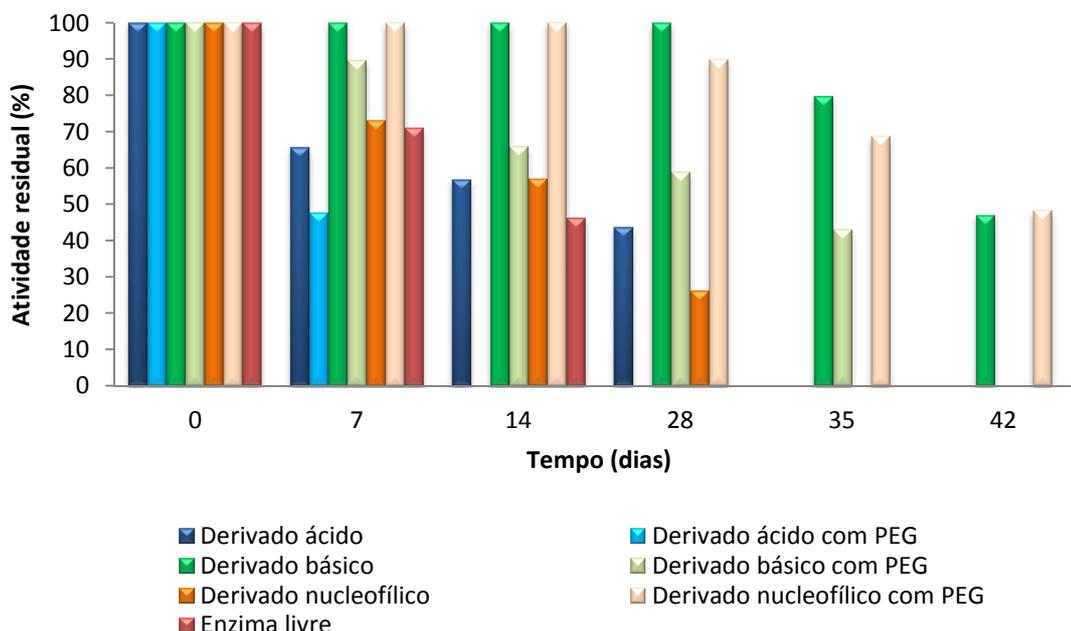
Os resultados obtidos demonstram que o efeito estabilizante do aditivo (PEG) estão coerentes com a literatura, que demonstram um aumento da atividade catalítica quando o suporte é tratado com polímeros orgânicos (KEELING-TUCKER et al., 2000; SOARES et al., 2002).

4.4 ESTABILIDADE DO ARMAZENAMENTO DOS DERIVADOS IMOBILIZADOS EM XEROGEL ÁCIDO, BÁSICO E NUCLEOFÍLICO

A estabilidade do armazenamento é um dos critérios mais importantes para a aplicação da enzima em escala industrial. Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com enzima livre, desde que se consiga um tempo de meia vida suficientemente longo para a enzima imobilizada, pois neste caso, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, que deveria, além de compensar as despesas adicionais com o procedimento de imobilização, ser inferior do que no caso da enzima livre (TUMTURK et al., 2006; ZANIN, 1989).

A Figura 9 corresponde o comportamento da atividade de esterificação residual para os derivados imobilizada no meio ácido, básico e nucleofílico com e sem a adição de aditivo (PEG 1500), armazenados a temperatura ambiente.

Figura 9 - Atividade de esterificação residual da lipase imobilizada e armazenada em temperatura ambiente.

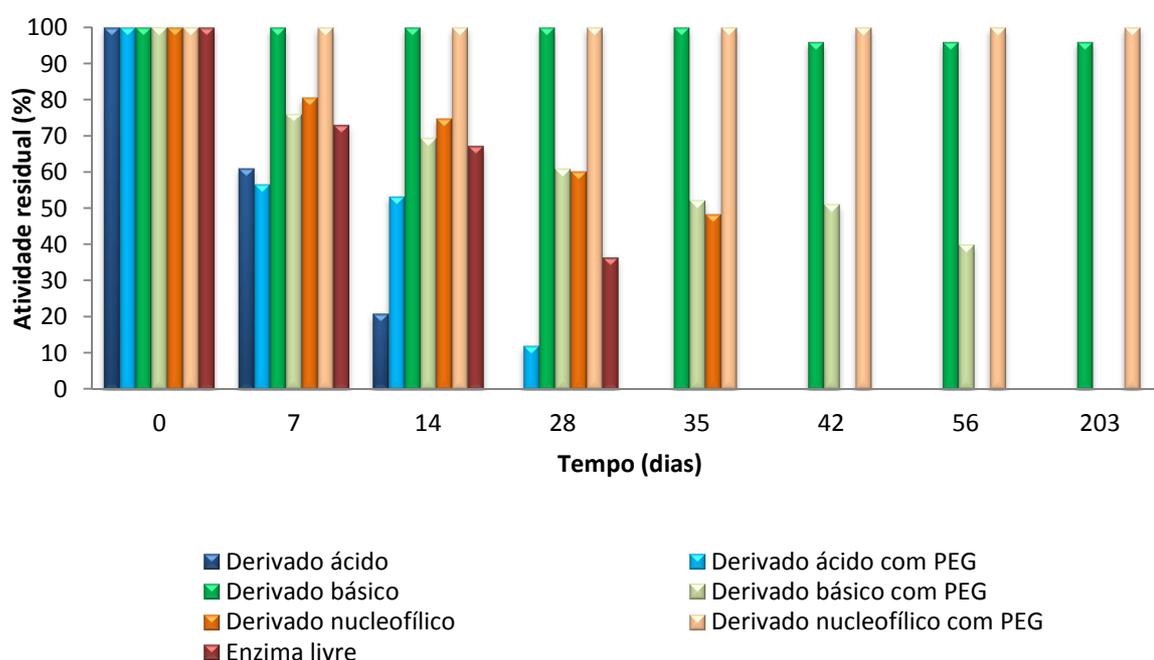


Independente da presença ou não do aditivo PEG, os derivados imobilizados básico e nucleofílico apresentaram atividades residuais superiores aos derivados imobilizados em meio ácidos. Considerando o mesmo derivado, observam-se tendências distintas em função da presença ou não de PEG. Os derivados imobilizados ácido e básico apresentaram maiores tempos de meia vida para as amostras sintetizadas sem o PEG, sendo que destes a maior diferença (de 7 para 28 dias, ou seja, 300 %) é observada para o meio ácido. Tendência contrária foi observada para o derivado nucleofílico. Para este derivado, o sintetizado na

presença de PEG, com 42 dias, foi o que apresentou o maior tempo de meia vida. A enzima livre teve um tempo de meia vida armazenada em temperatura ambiente de 14 dias, ou seja, menor que a maioria dos derivados testados.

Quando armazenados em refrigeração na geladeira (Figura 10) os derivados apresentaram tendência similar aos obtidos quando do armazenamento em temperatura ambiente, ou seja, os derivados básicos e nucleofílico, apresentaram maiores tempos de meia vida em relação ao derivado ácido.

Figura 10 - Atividade de esterificação residual da lipase imobilizada e armazenada em refrigeração.



Entre os derivados, o básico sem aditivo e nucleofílico com aditivo, com 203 dias de armazenamento, foram os que apresentaram os melhores resultados. O derivado básico e o nucleofílico apresentaram tendências distintas em função ao uso do aditivo PEG. No derivado básico, a ausência do PEG proporcionou um maior ($\approx 500\%$) tempo de meia vida em relação ao com o uso do PEG. Os derivados nucleofílicos com PEG foram os que apresentaram os maiores tempos de meia vida. Os derivados ácidos, com tempos de meia vida de 7 dias (sem PEG) e 14 dias (com PEG) foram os que apresentaram os resultados menos promissores. A enzima livre apresentou um tempo de meia vida de 14 dias na geladeira.

Estes resultados demonstraram a potencialidade da metodologia proposta considerando o derivado básico e nucleofílico, que foram os que apresentaram tempos de meia vida superiores ao da enzima livre. Em relação ao aditivo, não se observa a mesma

tendências, mas sim, comportamentos distintos são observados para os derivados básicos e nucleofílicos, o que demonstra a necessidade da otimização do sistema.

Em relação à temperatura de armazenamento, os maiores tempos de meia vida, com 203 dias, foram observados para as amostras correspondentes aos derivados básico sem PEG e nucleofílico com PEG, armazenados em refrigeração.

Em função dos resultados dos derivados ácidos não terem sido satisfatórios, com tempos de meia vida similares ou inferiores aos observados para a enzima livre, optou-se por não testá-lo no decorrer do trabalho.

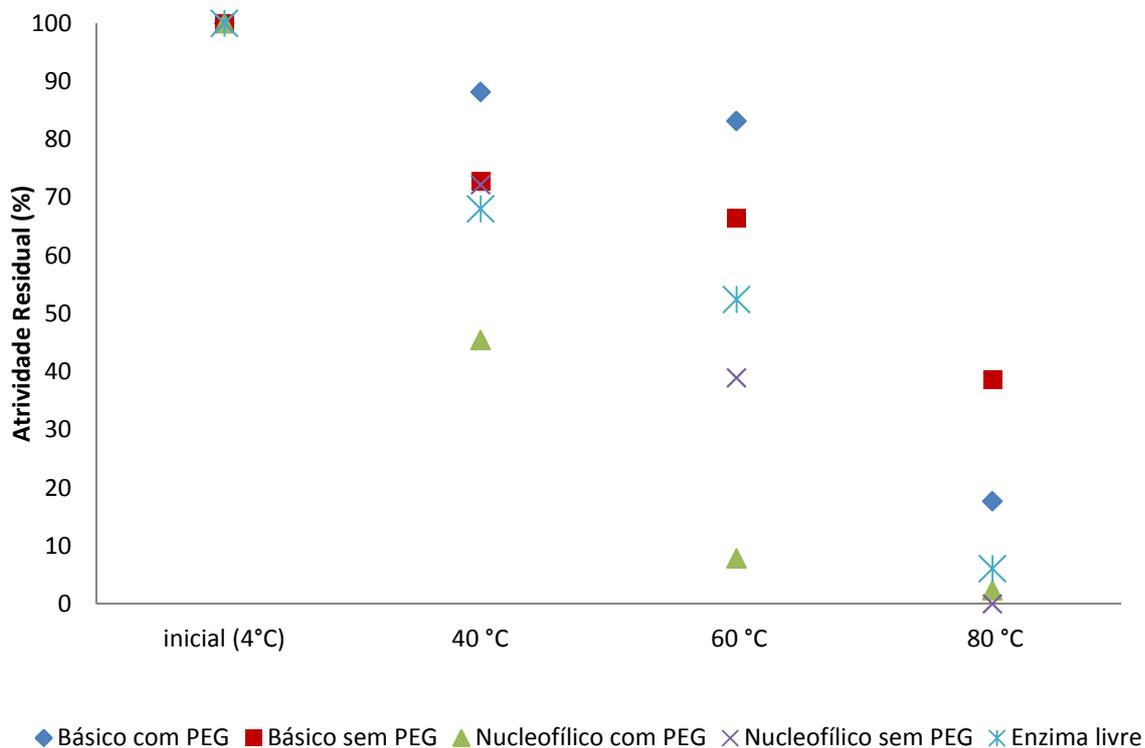
A capacidade para ser armazenada durante um período maior a uma determinada temperatura é um dos principais fatores a serem considerados quando se utiliza lipases imobilizadas. Neste contexto, com uma atividade residual de aproximadamente 100 % por 203 dias, o derivado básico sem PEG e nucleofílico com PEG, se destacam em relação aos resultados observados na literatura.

Soares et al. (2006), demonstram que a lipase imobilizada em sol-gel com a adição de PEG 1500 apresentou tempo de meia vida de 94 dias. Lipase imobilizada por ligação covalente em sol-gel (BRAGA et al., 2005) apresentaram uma redução de sua atividade em apenas 10 % no período de 30 d e 23 % após 60 dias. Buisson et al. (2001), observaram para a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em sistemas de sol-gel, uma atividade residual de 91 % após 3 meses de armazenamento em meio aquoso. Yilmaz et al. (2010; 2011), observou que as lipases de *Candida rugosa* imobilizadas em matriz sol-gel mantinham uma atividade residual de ≈ 90 % por 50 dias quando armazenadas a 4 °C enquanto a enzima livre, após 12 dias apresentou 15 % da atividade residual.

4.5 ESTABILIDADE TÉRMICA

A Figura 11 apresenta as atividades residuais de esterificação referentes a estabilidade térmica para os derivados básicos e nucleofílicos com e sem PEG ativados a temperaturas de 40, 60 e 80 °C em estufa por um período de 60 minutos.

Figura 11 - Atividade residual em diferentes temperaturas de contato durante 60 minutos.



De acordo com a Figura 11 todos os ensaios apresentaram a mesma tendência, de redução da atividade residual com o aumento da temperatura. Fica evidente que a estabilidade térmica dos derivados frente à enzima solúvel, é melhor na maioria dos imobilizados. A enzima na sua forma solúvel, apresenta certa flexibilidade, o que faz com que seu sítio ativo sofra mudanças conformacionais, estas, muitas vezes irreversíveis, tornando-a inativa. Quando imobilizada, ela se encontra numa forma mais rígida, devido as suas ligações com o suporte. Essa rigidez diminui a flexibilidade da enzima, e mantém a forma do sítio ativo, que é responsável por sua atividade catalítica (SILVA, 2007).

Entre os derivados, os com adição de PEG 1500 apresentaram os maiores valores de atividade residual em todas as temperaturas. A 80 °C, os únicos suportes a apresentarem atividade residual foram os básicos, com e sem o aditivo com atividade residual de 38 % e 20 %, respectivamente. Quando comparado os derivados imobilizados com a enzima livre, o derivado básico com e sem aditivo, em todas as temperaturas estudadas, apresentou maior atividade residual.

Carvalho et al. (2013) relataram que a enzima de *Bacillus* sp. ITP 001 imobilizada em matriz sol-gel teve 55 % de sua atividade inicial a 37 °C e menor que 50 % a 60 °C após 60 minutos de contato. Lipase de *Candida rugosa* foram imobilizadas em matriz sol-gel e incubadas por 2 horas a 60 °C. A enzima livre perdeu completamente sua atividade em 80

minutos a 60 °C, enquanto a enzima imobilizada manteve 54 % da atividade residual em 120 minutos a 60 °C (YILMAZ et al., 2010).

Souza (2013), para a enzima CAL B imobilizada em nano-partículas magnéticas observou uma perda de atividade de 20 % após 10 minutos a 60 °C. Nestas mesmas condições a enzima livre perdeu mais de 70 % de sua atividade inicial.

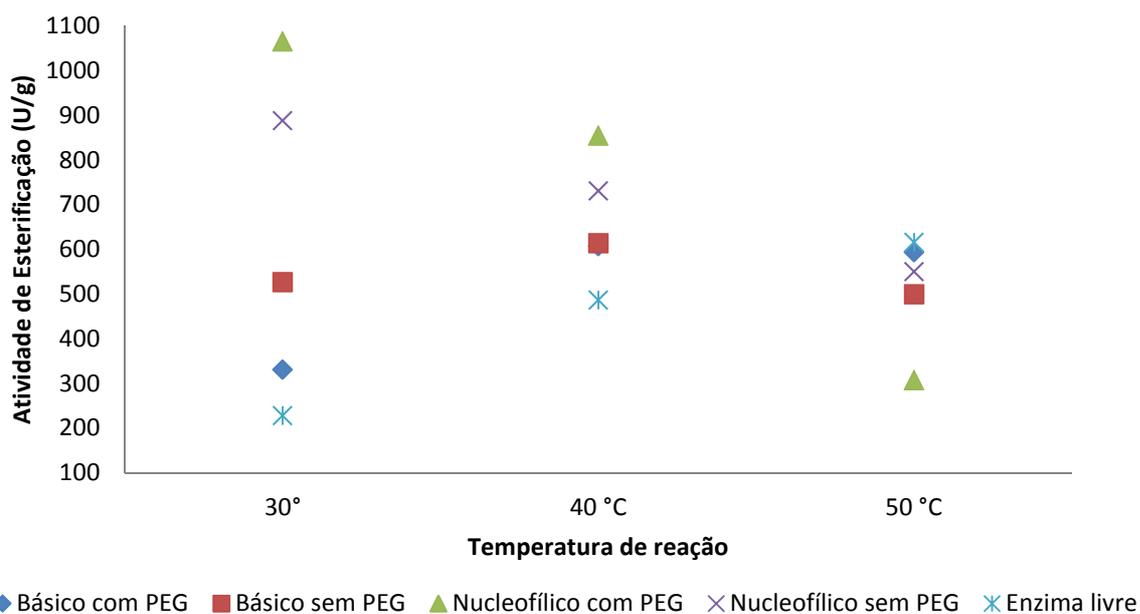
Lipases de *Candida rugosa* livre e imobilizada em quitosana por ligação covalente, foram incubadas a 50 °C por Simões et al. (2011). A lipase na forma livre apresentou 20 % da atividade residual após 60 minutos de incubação, enquanto a lipase na forma imobilizada manteve 60 % da atividade inicial nesse mesmo período de tempo. Esses dados indicam que o procedimento de imobilização atuou no sentido de aumentar a estabilidade térmica da enzima.

Para que uma enzima tenha potencial para aplicação industrial um requisito importante é a estabilidade térmica, já que muitos processos utilizam temperatura na faixa de 40 a 50°C (CARVALHO et al., 2013).

4.6 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A Figura 12 apresenta a atividade de esterificação empregando temperaturas reacionais de 30, 40 e 50 °C na reação de síntese de oleato de etila.

Figura 12 - Atividade de esterificação em diferentes temperaturas na reação de síntese.



Tendências distintas em termos de atividade são observadas entre os derivados (Figura 12). Para os derivados nucleofílicos observa-se uma diminuição na atividade com o aumento

da temperatura. Para os derivados básicos observa-se um aumento da atividade quando a temperatura passa de 30 para 40 °C seguido de uma diminuição da mesma quando a temperatura passa para 50 °C. Em todas as temperaturas os derivados com PEG, em relação aos sem PEG, foram os que apresentaram as maiores atividades. Entre eles o nucleofílico foi o que apresentou as maiores atividades nas temperaturas de 30 e 40 °C.

A enzima livre apresentou uma tendência de aumento de atividade com o aumento da temperatura para a região estudada, sendo que a 50 °C, sua atividade de esterificação (615 U/g) foi superior a dos derivados imobilizados para esta temperatura.

Ainda, de acordo com a Figura 12, o derivado nucleofílico, com e sem PEG, foi o que apresentou as maiores conversões a 30 °C. Estes resultados indicam que a enzima imobilizada não precisa de altas temperaturas (energia) para catalisar a reação de oleato de etila. Observa-se que as maiores atividades de esterificação foram para os derivados nucleofílicos com e sem aditivo a 30 °C, que corresponderam a atividade de 1065,2 e 887,8 U/g, respectivamente, enquanto que a atividade máxima da enzima livre foi de 615,18 U/g, porém a 50 °C.

Zhong et al. (2013), avaliou o efeito da temperatura (entre 10 e 60 °C) sobre a atividade de esterificação em ácido oleico e etanol (1:1) para a lipase de *Candida* sp. 99-125. Os melhores resultados foram obtidos a 25 °C, sugerindo um efeito negativo da temperatura sobre a atividade.

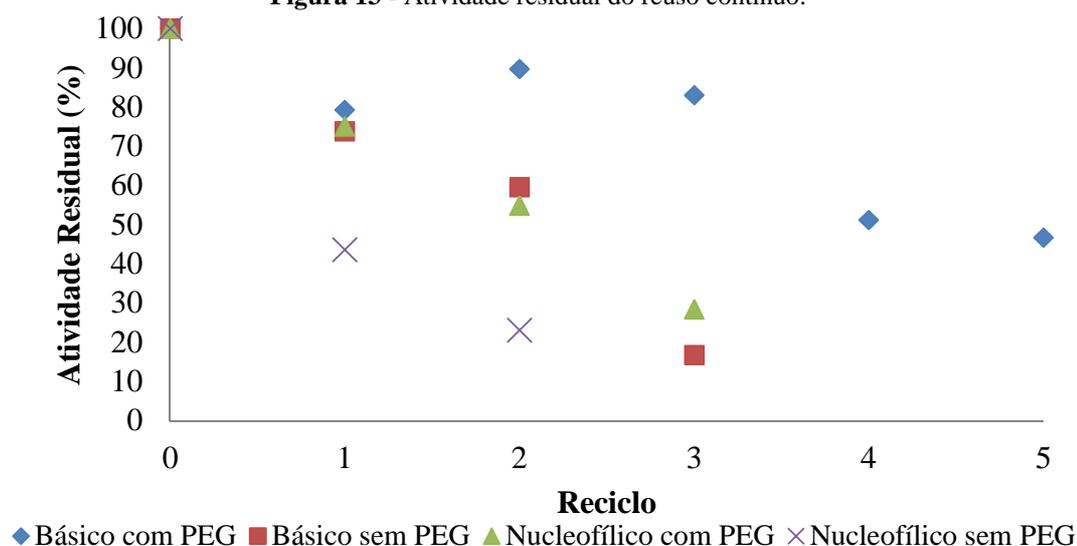
4.7 ESTABILIDADE OPERACIONAL (REUSO)

A reutilização de enzimas em mais de um ciclo de reação é um dos principais objetivos da imobilização, este fato é importante para as enzimas devido ao seu preço elevado, visto que, o custo da enzima é um dos principal problema quando se refere a sua aplicação industrial.

Normalmente, considera-se que uma enzima pode ser reutilizada até a sua atividade seja maior ou igual a 50 % do valor da atividade inicial.

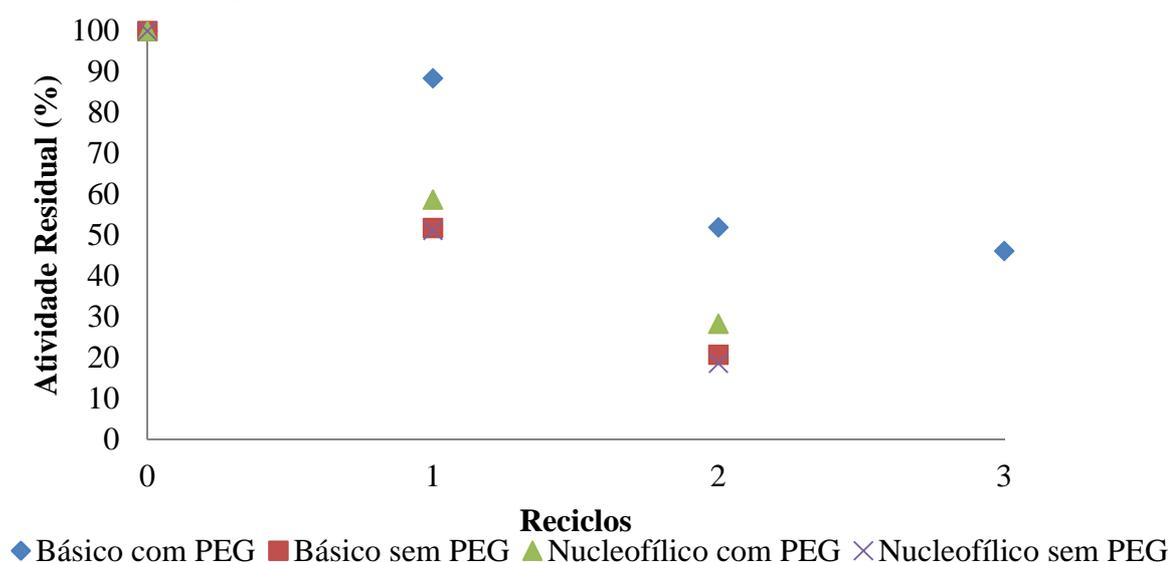
A possibilidade de reutilizar a lipase de *Candida antarctica* B imobilizada foi determinada por reações de síntese de oleato de etila empregando três diferentes métodos de reusos: Reuso contínuo, contínuo lavado com hexano e a cada 24 horas, apresentados nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

Figura 13 - Atividade residual do reuso contínuo.

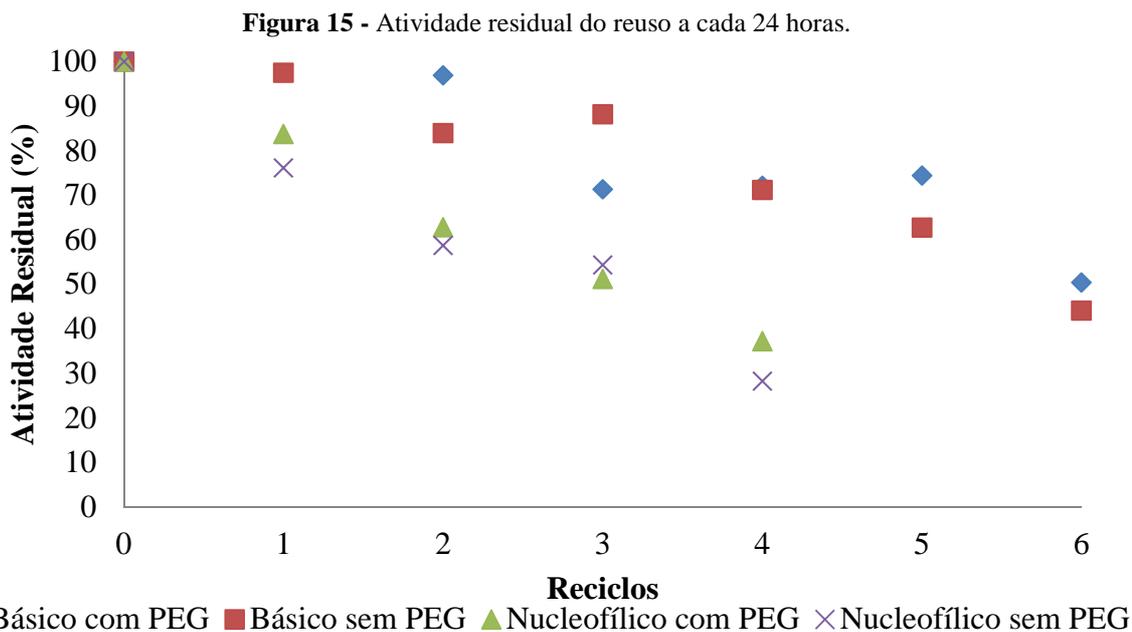


De acordo com a Figura 13, para o método contínuo, os derivados com PEG apresentaram melhores resultados do que os sintetizados na ausência do PEG, sendo que o derivado básico com 5 reusos foi o que apresentou os melhores resultados. Os resultados referentes ao reuso contínuo lavado com hexano (Figura 14) apresentam similaridade de tendência e valores, aos observados para o reuso contínuo. O único derivado a apresentar mais de um reuso (com 3 reusos) foi o básico com PEG.

Figura 14 - Atividade residual do reuso contínuo lavado com hexano.



Para o reuso a cada 24 horas (Figura 15) o derivado básico apresentou um número maior de reciclos do que o derivado nucleofílico, sendo mais indicado para esse método de reuso.



Para ambos os derivados, a presença do PEG não apresentou efeito, ou seja, os derivados com e sem PEG apresentaram o mesmo número de reusos, os básicos com 7 reusos e os nucleofílicos com 3 reusos cada.

Independentemente do tipo de reuso o maior número de repetições foi observado para o suporte básico com PEG. Dentre os reusos, o método com maior reusos foi o conduzido a cada 24 horas.

Cabe ressaltar que o decréscimo da atividade na catálise com consequência da redução da atividade residual pode estar relacionada à perda do suporte durante o processo, uma vez que o mesmo apresenta-se na forma de pó finamente dividido, o que dificulta sua recuperação para o reuso seguinte. Este fato pode justificar o menor número de reusos observados para o ensaio conduzido com lavagem de hexano.

Diversos trabalhos de pesquisa focada em melhorar a estabilidade e a reutilização de enzimas imobilizadas, possibilitaram a sua aplicação em escala industrial. Hara et al. (2008) mostrou que a lipase Amano PS de *Burkholderia cepacia* imobilizada por aprisionamento em sol-gel, com 8 reusos, apresentou uma boa capacidade de reutilização à temperatura ambiente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Yilmaz et al., (2011 e 2010) para a lipase de *Candida rugosa*, a qual permitiu sua reutilização por 5 vezes a 30 °C. Souza et al., (2012) conseguiu 3 reusos para a lipase de *Bacillus* sp. imobilizada pela técnica de sol-gel usando Aliquat 336 como aditivo. Carvalho (2011) e Simões et al. (2011), descreveram que a estabilidade operacional da atividade de esterificação foi menor que 50 % da atividade inicial

após o segundo uso da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em matrizes hidrofóbicas pela técnica sol-gel.

4.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MASSA DE ENZIMA E DE ADITIVO PEG 1500 NO RENDIMENTO DO DERIVADO IMOBILIZADO

Considerando os resultados anteriores e visando avaliar os efeitos da variáveis massa de enzima e massa do aditivo PEG no processo de imobilização, realizou-se um planejamento experimental para os derivados catalisados em meio básico e nucleofílico.

4.8.2 Planejamento de experimento para o derivado básico

A Tabela 6 apresenta os ensaios realizados para os diferentes valores de massas de enzima e aditivo PEG 1500 testadas no Planejamento Fatorial 2^2 , as variáveis codificadas (X_1 e X_2), assim como os resultados obtidos na imobilização.

Tabela 6 - Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 com três pontos centrais e os resultados obtidos da imobilização da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) pela técnica de sol-gel.

Experimento	X_1	X_2	AI	MS	AAI	ATS	RI
1	-1 (0,05)	-1 (0)	229,69	1,84	496,88	422,63	85,06
2	+1 (0,25)	-1 (0)	831,42	2,35	2484,38	1953,84	78,64
3	-1 (0,05)	+1 (0,05)	1032,61	1,42	496,88	1466,31	295,10
4	+1 (0,25)	+1 (0,05)	987,15	3,31	2484,38	3267,47	131,52
5	0 (0,15)	0 (0,025)	1379,72	1,88	1490,63	2593,87	174,01
6	0 (0,15)	0 (0,025)	1349,30	2,01	1490,63	2712,09	181,94
7	0 (0,15)	0 (0,025)	1359,46	1,93	1490,63	2623,76	176,02

X_1 : massa de enzima (g); X_2 : massa de aditivo (g); AI: Atividade do suporte imobilizado (U/g de suporte); MS: Massa do suporte imobilizado (g); AAI: Atividade adicionada na imobilização (U/g); ATS: Atividade total do suporte (U); RI: Rendimento do imobilizado (%).

Pode-se observar na Tabela 6 que fixando a quantidade de PEG e variando a massa de enzima (0,05 para 0,25 g) ocorre um decréscimo do valor da atividade inicial (AI), da atividade total do suporte (ATS) e conseqüentemente, o decréscimo do rendimento do imobilizado (RI). Quando se fixa os valores de enzima e varia-se a quantidade de aditivo PEG ocorre um aumento da atividade inicial (AI), da atividade total do suporte (ATS) e, conseqüentemente, do rendimento (RI). Para os experimentos 1 e 3 a atividade total do suporte aumentou de 422,2 para 1464,5 U/g e nos experimentos 2 e 4 as atividades totais variaram de 1.951,3 para 3.271,4 U/g respectivamente.

Os rendimentos maiores que 100 %, foram observados nos ensaios 3, 4, 5, 6 e 7. O maior rendimento, com 294,75 %, foi observado no ensaio conduzido empregando a menor massa de enzima e a maior massa de PEG. O aumento da massa de enzima, independente da massa de PEG proporcionou os menores rendimentos, indicando um efeito negativo da massa da enzima. Independente da massa de enzima, o emprego do PEG proporcionou um aumento do rendimento de imobilização, indicando um efeito positivo do PEG.

A Tabela 7 apresenta o coeficiente de regressão, o erro padrão, valores de t e p, para o rendimento de imobilização a um nível de confiança de 95 %.

Tabela 7 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento do Planejamento Fatorial 2^2 para o rendimento de imobilização em função da massa de enzima e de PEG.

Fonte de variação	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	160,33	8,59	18,66	0,00
X1	-42,50	11,37	-3,74	0,03
X2	65,73	11,37	5,78	0,01
X1.X2	-39,29	11,37	-3,46	0,04

X₁: massa de enzima (g); X₂: massa de aditivo

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, todos os fatores avaliados para a ativação foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) no se refere ao rendimento de imobilização. Observa-se o efeito negativo para a massa de enzima e um efeito positivo para a massa de PEG, indicando que um aumento do rendimento é obtido quando se diminui a massa de enzima e aumenta-se a massa de PEG.

Tabela 8 - Análise de variância dos resultados obtidos através dos experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 .

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F calculado
Regressão	30681,55	3	10227,18	19,79
Resíduo	1550,56	3	516,85	
Total	32232,11	6		

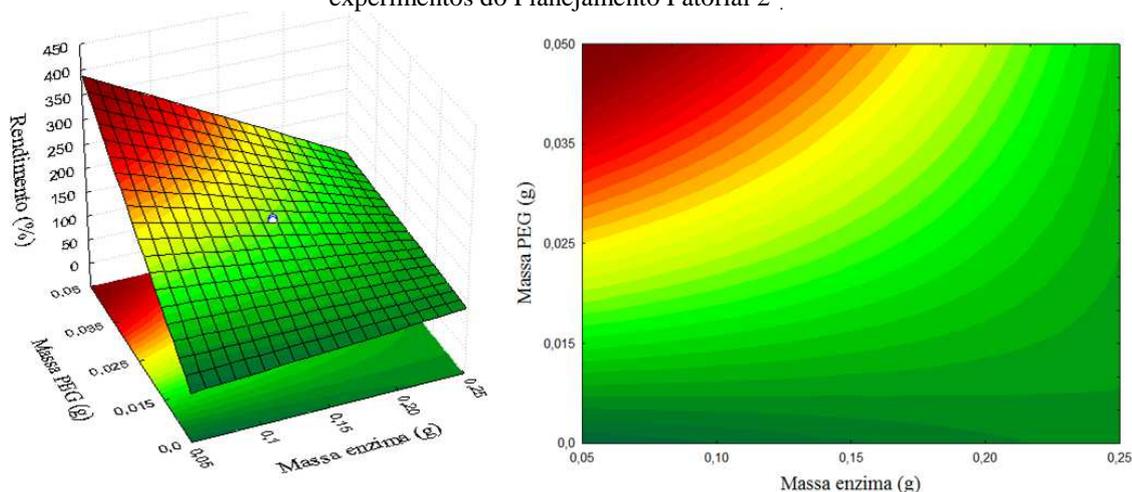
R²: 0,95; F_{tab}: 9,28

A Equação 7 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o rendimento de imobilização para o derivado básico em função das variáveis massa de enzima e massa de PEG. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 8), na qual se obteve um coeficiente de correlação de 0,95 e o F calculado é maior do que o F tabelado, que

permite, desta forma, a construção da superfície de resposta e/ou a curva de contorno apresentadas na Figura 16.

$$\text{Rendimento} = 160,33 - 42,50 \cdot X_1 + 65,73 \cdot X_2 - 39,29 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad \text{Equação 3}$$

Figura 16 - Superfície de resposta e curva de contorno das variáveis no rendimento do derivado básico nos experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 .



É possível observar na Figura 16 que a superfície de resposta apresenta o comportamento da imobilização em relação ao rendimento. Pode-se observar que a tendência para o ponto ótimo de rendimento encontra-se em valores mínimos de massa de enzima e valores máximos de aditivo PEG 1500.

4.8.1 Planejamento de experimento para o derivado nucleofílico

A Tabela 9 apresenta os ensaios realizados no experimento obtidos para os diferentes valores de massas de enzima e aditivo PEG 1500 testadas no Planejamento Fatorial 2^2 , bem como as variáveis codificadas (X_1 e X_2) e as respostas obtidas na imobilização.

O suporte nucleofílico apresentou comportamento similar ao suporte básico em relação as variáveis estudadas. Quando fixou-se a quantidade de PEG e variou-se a massa de enzima de 0,05 para 0,25 g ocorre um decréscimo do valor da atividade inicial (AI), da atividade total do suporte (ATS) e do rendimento (RI), sendo que nos últimos esta diferença é mais perceptível. Quando fixa-se os valores de enzima e varia-se a quantidade de aditivo PEG observa-se um aumento da atividade inicial (AI), da atividade total do suporte (ATS) e do rendimento (RI).

Tabela 9 - Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 com três pontos centrais e os resultados obtidos da imobilização da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) pela técnica de sol-gel.

Experimento	X ₁	X ₂	AI	MS	AAI	ATS	RI
1	-1 (0,05)	-1 (0)	194,42	2,74	478,13	532,71	111,42
2	+1 (0,25)	-1 (0)	199,77	5,04	2390,63	1006,84	42,12
3	-1 (0,05)	+1 (0,05)	214,49	4,10	478,13	879,41	183,93
4	+1 (0,25)	+1 (0,05)	252,19	6,56	2390,63	1700,29	71,12
5	0 (0,15)	0 (0,025)	264,73	4,32	1434,38	1143,63	79,73
6	0 (0,15)	0 (0,025)	257,25	4,19	1434,38	1077,88	75,15
7	0 (0,15)	0 (0,025)	286,85	3,76	1434,38	1078,56	75,19

X₁: massa de enzima (g); X₂: massa de aditivo (g); AI: Atividade do suporte imobilizado (U/g de suporte); MS: Massa do suporte imobilizado (g); AAI: Atividade adicionada na imobilização (U/g); ATS: Atividade total do suporte (U); RI: Rendimento do imobilizado (%).

Os maiores rendimentos de 111,4 % e 183,9 %, foram observados nos ensaios 1 e 3, respectivamente, ou seja, nos ensaios conduzidos com a menor massa de enzima.

Para este suporte, o aumento da massa de enzima, independente da massa de PEG também proporcionou os menores rendimentos, indicando um efeito negativo da enzima. Independente da massa de enzima, o emprego do PEG proporcionou um aumento do rendimento de imobilização, indicando um efeito positivo do PEG.

Comportamento semelhante foi descrito por Soares et al. (2003) em que a lipase microbiana de *Candida rugosa* foi imobilizada em sílica de porosidade controlada com o uso do aditivo PEG 1500. Os autores observaram uma diminuição do rendimento de 59,5 % para 41,9 % quando a massa de enzima foi aumentada de 0,1 g e 0,3 g.

Os valores de rendimento de imobilização dos experimentos 1 e 3 são superiores aos encontrados na literatura. Pereira et al. (2003) imobilizaram lipases em quitosana e obtiveram um rendimento inferior a 17 %. Bayramoglu et al. (2004) imobilizaram α -amilase em membrana porosa obteram rendimentos menores de 80 % em seus trabalhos.

A Tabela 10 apresenta o coeficiente de regressão, o erro padrão, valores de t e p, para o rendimento de imobilização a um nível de confiança de 90 %.

Tabela 10 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento do Planejamento Fatorial 2^2 para o rendimento de imobilização em função da massa de enzima e de PEG.

Fonte de variação	Coeficiente de regressão	Erro padrão	T	p
Média	91,09	7,25	12,57	0,00
X ₁	-45,78	9,59	-4,77	0,02
X ₂	25,63	9,59	2,67	0,08
X ₁ .X ₂	-10,63	9,59	-1,11	0,35

X₁: massa de enzima (g); X₂: massa de aditivo

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, apenas a variável massa de enzima mostrou-se significativa ao nível de 95 % de confiança, enquanto o efeito massa de aditivo PEG 1500 e a interação entre a massa de enzima e aditivo foram significativo ao nível de 90 % de confiança para a faixa experimental avaliada.

A equação 8 apresenta o modelo codificado de primeira ordem que descreve o rendimento de imobilização para o derivado nucleofílico em função das variáveis massa de enzima e massa de PEG. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 11), na qual se obteve um coeficiente de correlação de 0,95 e o F calculado é maior do que o F tabelado, que permite, desta forma, a construção da superfície de resposta e/ou a curva de contorno apresentadas na Figura 17.

Tabela 11 - Análise de variância dos resultados obtidos através dos experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 .

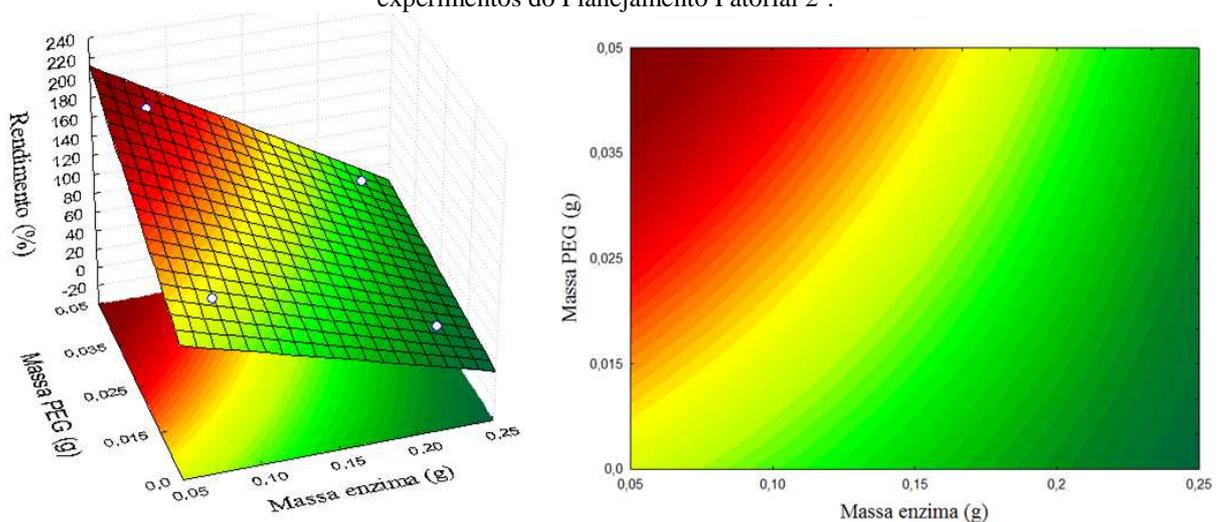
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F calculado
Regressão	11461,17	3	3820,39	10,39
Resíduo	1103,15	3	367,72	
Total	12564,32	6		

$R^2: 0,91$ $F_{\text{tab}}: 5,39$

$$\text{Rendimento} = 91,09 - 45,78.X_1 + 25,63.X_2 - 10,63.X_1.X_2$$

Equação 4

Figura 17 - Superfície de resposta e curva de contorno das variáveis no rendimento do derivado nucleofílico nos experimentos do Planejamento Fatorial 2^2 .



A superfície de resposta apresenta o comportamento da imobilização em relação ao rendimento. Pode-se observar que a tendência ao ponto ótimo de rendimento encontra-se em

valores mínimos de massa de enzima e valores maiores de aditivo PEG 1500. Resultado semelhante ao encontrado na imobilização catalisado em meio básico (Figura 16).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o efeito estabilizante do aditivo PEG e estão coerentes com a literatura, a qual atribui o aumento da atividade e, conseqüentemente, do rendimento da imobilização, a provável proteção da enzima contra a agregação ou desnaturação devido à presença de silanos utilizados na formação da matriz sílica (CARVALHO, 2011; SOARES et al., 2003).

Resultados similares foram descritos por Villeneuve et al. (2000) em reação de transesterificação do ácido esteárico com óleo de palma empregando lipase de *Rhizopus* spp. imobilizada em sílica. Segundo esses autores, o aditivo PEG-1500 serve como “braço” espaçador em meio orgânico, facilitando a reação catalisada por enzimas imobilizadas, provavelmente devido ao fato deste “braço” minimizar as interações hidrofóbicas e a atração eletrostática entre a proteína e o suporte. Provavelmente nos resultados obtidos no presente trabalho, o PEG tenha desempenhado um comportamento similar.

A concentração da enzima na solução de imobilização, ou seja, a carga enzimática oferecida para a imobilização, também pode afetar a distribuição da enzima imobilizada no suporte. Estudos reportados na literatura indicam que quanto mais concentrada a solução de enzima utilizada na imobilização, mais heterogênea apresenta-se a distribuição interna da enzima imobilizada, pois, tende a se acumular nas camadas mais superficiais da partícula do suporte, o que interfere a quantidade de enzima imobilizada e a medida da atividade enzimática do derivado (MENDES et al, 2006; RODRIGUES et al., 2008).

4.9 DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO DA REAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES AROMATIZANTES

A síntese enzimática de compostos de aroma é mais específica e viável em relação à extração química a partir de vegetais, pois independe da estação, clima e variação geográfica e não requer grandes quantidades de matéria-prima (RAZAFINDRALAMBO et al., 1994).

A reação de síntese de acetato de isoamila, o qual caracteriza aroma de banana, foi testado nos pontos de maiores rendimentos dos derivados imobilizados básico e nucleofílico, que resultaram nas conversões apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Conversões de acetato de isoamila com o uso dos derivados básico e nucleofílico.

Suporte	Conversão (%) Acetato de isoamila
Derivados nucleofílico	65,88
Derivados básico	71,34

Observa-se na Tabela 12 que os derivados apresentaram, nas condições testadas, valores próximos de conversão na síntese de acetato de isoamila de 65,8 % e 71 % para o derivado nucleofílico e básico, respectivamente. Estes resultados indicam a possibilidade de utilização do derivado imobilizado na síntese de outros aromas, porém, é necessário um estudo através de um planejamento de experimentos a fim de aperfeiçoar o processo.

Vários estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres sintetizados com altos rendimentos utilizando diversas lipases de origem microbiana (NOGALES et al., 2005; ROMERO et al., 2007; SHIH et al., 2007). Os ésteres produzidos por síntese enzimática são predominantemente obtidos em meios orgânicos com baixo conteúdo de água, mantendo assim a conformação ativa da lipase e sua termoestabilidade (BEZBRADICA et al, 2007).

A máxima porcentagem de esterificação atingida no estudo de Aragão et al. (2009), para a síntese de butirato de isoamila foi utilizando 3 g L⁻¹ de Lipozyme TL IM como biocatalisador a 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool:ácido 1:1 e concentração do ácido de 0,06M, alcançando uma conversão superior a 80 % em 48 h.

Mahapatra et al. (2009) estudaram o efeito da quantidade de enzima na esterificação de acetato de n-butila e acetato de n-propila, no qual foi variado a massa de lipase de *Rhizopus oligosporus* imobilizada em gel de sílica reticulada de 2,5 % (1,5 U/mL) a 30 % (18 U/mL) (m/v) a 30 °C. Observou-se que 50 e 56% de conversão molar de síntese pode ser alcançada após 24 h de reação a uma concentração de enzima de 25 % (15 U/mL).

5 CONCLUSÕES

Foi possível imobilizar a enzima lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) por encapsulamento em matriz hidrofóbica obtida pela técnica de sol-gel utilizando três diferentes meios de catálise (ácido, básico e nucleofílico), com e sem o emprego do aditivo polietilenoglicol (PEG-1500).

Os experimentos realizados permitiram selecionar a lipase *Candida antarctica* B imobilizada nos xerogéis básico e nucleofílico como os melhores derivados, pois, apresentaram melhor estabilidade em armazenamento quando comparados com a enzima livre e a enzima imobilizada em xerogel ácido.

O processo de imobilização proporcionou um aumento na estabilidade térmica, de armazenagem e operacional em relação à enzima livre. As condições de armazenamento influenciaram na estabilidade. As amostras armazenadas em refrigeração apresentaram os maiores tempos com atividade residual próxima a 100 %.

Os resultados demonstram a possibilidade de reutilizar os derivados básico e nucleofílico por até sete vezes, considerando 50% de atividade residual. Além disto, foi possível observar o efeito do tipo de tratamento entre os ciclos. A lavagem com hexano, por exemplo, proporcionou o menor número de ciclos, independente do derivado. Um planejamento experimental 2^2 foi proposto para verificar a influência no rendimento de imobilização das variáveis, massa de enzima e massa do aditivo PEG 1500.

O emprego do aditivo PEG 1500, independentemente da massa de enzima, proporcionou um aumento na atividade do derivado e conseqüentemente do rendimento. O planejamento experimental demonstrou efeito negativo para a massa de enzima e positivo para o aditivo PEG 1500 sobre o rendimento da imobilização.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Avaliar a imobilização da enzima *Candida antarctica* B pela técnica de sol-gel com o uso de outros precursores de sílica como o trimetilortosilicato (TMOS) para a preparação de xerogéis e aerogéis;
- b) Testar o uso de diferentes aditivos na imobilização como polietilenoglicol (PEG), polivinil álcool (PVA) e líquidos iônicos;
- c) Realizar a secagem com o emprego de dióxido de carbono (CO₂) em meio supercrítico nas matrizes puras e nos biocatalisadores imobilizados (derivados) para a obtenção dos aerogéis;
- d) Otimizar o processo de secagem em meio supercrítico;
- e) Avaliar a estabilidade frente a diferentes pH e temperatura;
- f) Verificar o potencial dos derivados imobilizados em reações de hidrólise, esterificação e síntese de diferentes aromas;
- g) Otimizar as reações nas quais serão aplicadas a enzima imobilizada;
- h) Avaliar a estabilidade operacional (reusos) dos derivados nas diferentes reações na qual serão aplicados;
- i) Avaliar a viabilidade econômica do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 589-595, 2003.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406-6436, 2013.
- ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, R. B. Stabilization of Penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 529-538, 2005.
- ALFAYA, A.; KUBOTA, L. T. A. Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 935-841, 2002.
- ANVIR, D. Organic chemistry within ceramic matrices: doped sol-gel materials. **Accounts Chemical Research**, v. 28, p. 328-234, 1995
- ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. DE M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, p. 2268-2272, 2009
- AVNIR, D.; BRAUN, S.; LEV, O.; OTTOLENGHI, M. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. **Chemistry of Materials**, v. 6, p. 1605-1614, 1994.
- AVNIR, D.; CORADIN, T.; LEV, O.; LIVAGE, J. Recent bio-applications of sol-gel materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, p. 1013-30, 2006.
- BACHA, A. B.; GARGOURI, Y.; ALI, Y. B.; MILED, N.; REINBOLT, J.; MEJDOUB, H. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 309-317, 2005.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 591-599, 2004.
- BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 97-101, 2007.
- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 7, p. 546-552, 1992.

BOAVENTURA, R. F. **Imobilização de lipase por diferentes metodologias na presença de líquidos iônicos e aplicação na produção de ésteres etílicos derivados de óleo de girassol.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade Tiradentes. Aracajú-SE, 2013.

BON, E. P. S.; MARIA, A.; FERRERA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado.** Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2008.

BRAGA, L. P.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F. Uso e reutilização da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido obtido pela técnica sol-gel. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.** 2005.

BRÍGIDA, A.; PINHEIRO, Á.; FERREIRA, A.; GONÇALVES, L. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 173-187, 2008.

BRINKER, C. J. Hydrolysis and condensation of silicates: effects on structure. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 100, p. 31-50, 1988.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-Gel Science- The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing.** Academic Press. Inc.: San Diego, 1990.

BRUNAUER, S.; EMMET, T. P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.

BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. The Sol-Gel Preparation of Silica Gels. **Journal Chemistry Education**, v. 71, p. 599, 1994.

BUISSON, P.; HERNANDEZ, C.; PIERRE, M.; PIERRE, A. C. Encapsulation of lipases in aerogels. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 285, p. 295-302, 2001.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática.** Ed. Lidel-Edições Técnicas, Lisboa, 2003.

CAO, X.; YANG, J.; SHU, L.; YU, B.; YAN, Y. Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bio imprinting with substrate analogues. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 177-182, 2009.

CARVALHO, N. B. **Produção de ésteres etílicos e emulsificantes utilizando lipase imobilizada em matrizes hidrofóbicas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes. Aracajú-SE. 2011.

CARVALHO, N. B.; BARBOSA, J. M. P.; OLIVEIRA, M. V. S.; FRICKS, A. T.; LIMA A. S.; SOARES, C. M. F. Biochemical properties of *Bacillus* sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol-gel process. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 52-58, 2013.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analítica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; TANEJA, S. C.; QAZI, G.N. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 154-160, 2009.

CHAUDHURY, N. K.; GUPTA, R.; GULIA, S. Sol-gel technology for sensor applications. **Defence Science Journal**, v. 57, p. 241-253, 2007.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; DELORME, P.; WILLEMOT, R. M. Kinetic study of esterefication by immobilized lipase in n-hexane. **FEBS Letters**, v. 276, n.1, p. 181-184, 1990.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DENG, X.; FANG, Z.; LIU, Y.; YU, C. Production of biodiesel from Jatropha oil catalyzed by nanosized solid basic catalysis. **Energy**, v. 36, p. 777-784, 2011.

DUMITRIU E.; SECUNDO F.; PATARIN J.; FECHETE I. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 119-133, 2003.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**: A Textbook, 3rd Edition, Berlin: Springer Productions-Gesellschaft, 1997.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.; COCCA, J.; MATEO, C.; MORO, P.; TERRENI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. Regio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis. **Tetrahedron**, v. 59, n. 30, p. 5705-5711, 2003.

FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 75, p. 569-576, 2000.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 3ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2002.

FONSECA, M. G.; AIROLDI, C. Inorganic-organic hybrids derived from the reaction of phyllosilicates with organosilanes. **Química Nova**, v. 26, p. 699-707, 2003.

FORESTI, M.; FERREIRA, M. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107, p. 23-30, 2005.

FURUKAWA, S.; KAWAKAMI, K. Characterization of *Candida rugosa* lipase entrapped into organically modified silicates in esterification of menthol with butyric acid. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, p. 240-242, 1998.

GONÇALVES, A. M.; SCHACHT, E.; MATTHIJS, G.; BARROS, M. R. A.; CABRAL, J. M. S.; GIL, M. H. Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 60-66, 1999.

GREGG, S. J., SING, K. S. W. **Adsorption, Surface area and Porosity**. Academic Press, London, 1982.

GUAN-SAJONZ, H., GUIOCHON, G., DAVIS, E., GULAKOWSKI, K., SMITH, D.W. Study of the physico-chemical properties of some packing materials. III. Pore size and surface area distribution. **Journal of Chromatography A**, v. 773, p. 33-51, 1997.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2nd ed., Humana Press Inc. Madrid, Spain, 2006.

HARA, P.; HANEFELD, U.; KANERVA, L.T. Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, p. 80-86, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemistry Reviews**, v. 90, p. 33-72, 1990.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O Processo Sol-Gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1995.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.; ZHENG, S.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CAL B-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 108-114, 2012.

JOSÉ, M. N.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânicos e inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, p. 281-288, 2005.

KATCHALSKI-KATZIR, E; KRAEMER, D. M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 10, p. 157-176, 2000.

KEELING-TUCKER et al., 2000;

KEELING-TUCKER, T.; RAKIC, M.; SPONG, C.; BRENNAN, J. D. Activity of lipase within sol-gel derived bioglasses via organo silane and polymer doping. *Chemistry Materials*, v. 12, p. 3695-4704, 2000.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research e Development**, v. 6, p. 446-451, 2002.

KISS, M.; SEFANOVITS-BÁNYAI, É.; TOTH, A.; BOROSS, L. Extractive synthesis of ethyl-oleate using alginate gel co-entrapped yeast cells and lipase enzyme. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 5, p. 460-464, 2004.

KUMAR, R.; MODAK, J.; MADRAS, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p. 199-202, 2005.

LARIOS, A.; GARCIA, H. S.; OLIART, R. M.; VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 373-376, 2004.

LEHNINGER, A. L.; COX, M. L.; NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica**. Traduzido por Lodi, W. R.; Simmes, A. A., 4ª edição, Sarvier, São Paulo, 2006.

LOZANO, P.; PÉREZ-MARIN, A.; DIEGO, T. D.; GÓMEZ, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M.; RIOS, G.; IBORRA, J. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. **Journal of membrane science**, v. 201, n. 1, p. 55-64, 2002.

LOZANO, P.; VÍLLORA, G.; GÓMEZ, D.; GAYO, A. B.; SÁNCHEZ-CONESA, J. A.; RUBIO, M.; IBORRA, J. L. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 121-128, 2004.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 57-63, 2009.

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

MAUGARD, T.; LEGOY, M. Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin a in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, n. 4, p. 275-280, 2000.

MENDES, A. A.; BARBOSA, B. C. M.; SOARES, C. M. F.; SILVA, L. C. P. S.; CASTRO, H. F. Atividade e estabilidade operacional de lipase imobilizada em fosfato de zircônio na ausência e presença de polietilenoglicol. **Acta Scientiarum Technology**, v. 28, n. 2, p. 133-140, 2006.

MESSING, R. A. **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**, New York: Academic Press, p.63, 1975.

NOGALES, J. M. R.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 63-68, 2005.

PAIVA, A. I.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.

PALOMO J. M.; MUÑOZ G.; FERNÁNDEZ-LORENTE G.; MATEO C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R.; GUISÁN J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 279-286, 2002.

PALOMO, J. M.; SEGURA, R.; MATEO, C.; TERRENI, M.; GUISAN, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, n. 4, p. 869-874, 2005.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 343-355, 2003.

PIROZZI, D.; GRECO, G. Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 2, p. 94-100, 2004.

RAMOS, M. A.; GIL, M. H.; SCHACHT, E.; MATTHYS, G.; MONDELAERS, W.; FIGUEIREDO, M. M. Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives. **Powder Technology**, v. 99, p. 79-85, 1998.

RAZAFINDRALAMBO, H.; BLECKER, C.; LOGNAY, G.; MARLIER, M.; WATHELET, P.; SEVERIN, M. Improvement of enzymatic synthesis yields of flavour acetates: the example of the isoamyl acetate. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 247-250, 1994.

REETZ, M. T.; TIELMANN, P.; WISENHOFER, W.; KONEN, W.; ZONTA, A. Second Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts. **Advanced Synthesis e Catalysis**, v. 345, p. 717-728, 2003.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 527-534, 1996.

ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 61-67, 1998.

RODRIGUES, D.; MENDES, A.; ADRIANO, W.; GONÇALVES, L.; GIORDANO, R. Multipoint covalente immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 269-277, 2007.

SANCHEZ, C.; LIVAGE, L.; HENRY, M., BABONNEAU, F. Chemical modification of alcoxide precursors. **Journal of non-crystalline solids**, v. 100, p. 65-76, 1988.

SEIDEL, A.; KIRK, R. E.; OTHMER, D. F.; KROSCWITZ, J. I.; GRANT, M. H. **Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology**. Hardcover, 1084 p., 2007.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis e Catalysis**, v. 349, p.1289-1307, 2007.

SHIH, I. L.; HUNG, S. H.; CHEN, F. Y.; JU, H. Y.; SHIEH, C. J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1223-1228, 2007.

SILVA, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina A**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

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

SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P.O. Enantioselective behavior of lipases from *Aspergillus niger* immobilized in different supports. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 949-954, 2009.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. MENDES, A. A. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, p. 33-38, 2011.=

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Selection of Stabilizing Additive for Lipase Immobilization on Controlled Pore Silica by Factorial Design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 91-93, p. 703-718, 2001.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in the presence of polyethylene glycol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 863-874, 2002.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Imobilização de lípase em sílica de porosidade controlada na presença de proteínas não enzimáticas. In: XIII **Congresso Brasileiro de Engenharia Química** – Anais do XIII COBEQ, Campinas-SP, 2000.

SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 832-838, 2003.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 69-76, 2006.

SOUZA, M. C. M. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2013.

SOUZA, R. L.; BARBOSA, J. M. P.; ZANIN, G.M.; LOBÃO, M. W. N.; SOARES, C. M. F., LIMA, A. S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 288-300, 2010.

SOUZA, R. L.; RESENDE, W. C.; BARÃO, C. E.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. DE; SANTOS, O. A. A.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p.152-159, 2012.

STRAATHOF, A.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

SVENDSEN, A.; CLAUSEN, I. G.; PATKAR, S. A.; BORCH, K.; THELLERSEN, M.; Protein engineering of microbial lipases of industrial interest. **Methods in Enzymology**, v. 317, p. 284-340, 1997.

TARDIOLI, P. W.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Design of new immobilized-stabilized carboxy-peptidase. A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 565-574, 2003.

TRODLER, P.; PLEISS, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. **BMC Structural Biology**, v. 8, n. 1, p. 9-19, 2008.

TUMTURK, H.; KARACA, N.; DEMIREL, G.; SAHIN, F. Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) kappa-carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. **Internationa Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 281-285, 2006.

UPPENBERGER, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase-B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, p. 293-308, 1994.

VILA-REAL, H.; ALFAIA, A. J.; ROSA, J. N.; GOIS, P. M. P.; ROSA, M. E.; CALADO, A. R. T.; 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**, v. 152, p. 147-158, 2011.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HASS, M. J. C. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WELSH, F.; WILLIAMS, R.; DAWSON, K. Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1679-1682, 2006.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**, 3^a ed., Ellis Horwood: London, 1995.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; YOUNG, M. M. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.

YAMANE, T.; KOJIMA, Y.; ICHIRYU, T.; NAGATA, M.; SHIMIZU, S. Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene: Factors affecting activity of pure enzyme. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 10, p. 1063-1069, 1990.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Enantioselective hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 162-168, 2010.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 35-41, 2011.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 82, p. 3192-3196, 1985.

ZANIM, G. M. **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Aminoglicosidase Imobilizada**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1989.

ZHONG, H.; FANG, Z.; ZOU, B.; LI, X.; OUYANG, P.; GUO, K. Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 114-117, 2013.

ZHOU, Y. Recent Advances in Ionic Liquids for Synthesis of Inorganic Nanomaterials. **Current Nanoscience**, v. 1, p. 35-42, 2005.

ZOPPI, R. A.; NUNES, S. P. Uso do Processo Sol-Gel na Obtenção de Materiais Híbridos Organo-Inorgânicos: Preparação, Caracterização e Aplicação em Eletrólitos de Estado Sólido. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Out/Dez, p. 27-97, 1997.