

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

GLACIELA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA SCHERER

**IMOBILIZAÇÃO *IN SITU* DE LIPASE AK DE *Pseudomonas fluorescens* EM
MATERIAIS MESOPOROSOS DO TIPO MCM-48**

ERECHIM, RS – BRASIL

2017

GLACIELA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA SCHERER

**IMOBILIZAÇÃO *IN SITU* DE LIPASE AK DE *Pseudomonas fluorescens* EM
MATERIAIS MESOPOROSOS DO TIPO MCM-48**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo
Curso de Pós-Graduação em Engenharia
de Alimentos, Departamento de Ciências
Agrárias da Universidade Regional
Integrada do Alto Uruguai e das Missões –
Campus de Erechim**

Orientadoras: Dra. Jamile Zeni

Dr. Marcelo Luis Mignoni

ERECHIM, RS - BRASIL

2017

GLACIELA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA SCHERER

**IMOBILIZAÇÃO *IN SITU* DE LIPASE AK DE *Pseudomonas fluorescens* EM
MATERIAIS MESOPOROSOS DO TIPO MCM-48**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo
Curso de Pós-Graduação em Engenharia
de Alimentos, Departamento de Ciências
Agrárias da Universidade Regional
Integrada do Alto Uruguai e das Missões –
Campus de Erechim**

Erechim, 10 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Jamile Zeni
URI –Erechim

Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni
URI-Erechim

Prof. Dr. Alexander Junges
URI-Erechim

Prof^a. Dra. Clarissa Dalla Rosa
UFFS- Erechim

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – ERECHIM

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção de poder viver e apreciar este momento de alegria.

À minha família, ao meu esposo Edimar e filhos Tailine e Bruno, por me apoiarem nesta caminhada, pela motivação e apoio incondicional, meus guias e pilares nos momentos difíceis. Obrigado por acreditarem nos meus sonhos e amenizarem a distância.

Aos professores Marcelo Mignoni e Jamile Zeni, pela orientação, paciência e compreensão, mas principalmente, pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-ERECHIM, pelos conhecimentos compartilhados e amizade.

Às anjinhas, Alexandra, Daniela, Fernanda, Janine e Mariane, pela amizade verdadeira, ensinamentos e pelos belos e bons momentos de estudo e parceria para tudo. Serei eternamente grata por ter vocês em meu caminho, vocês são responsáveis pelas melhores lembranças do mestrado.

À Sandy (Ilizandra Fernandes), por me apresentar aos laboratórios e por transmitir seu conhecimento com boa vontade, alegria e disposição.

À Raieli Segalla, pelas trocas de ideias e explicações no início dos trabalhos, pelo material de estudos e de laboratório.

À Nadia Nyari, pelos valorosos ensinamentos, por vezes científicos e por vezes nem tão científicos. Obrigada pela companhia, pelas horas de explicações e estudo, por compartilhar seu conhecimento e por sempre dispor de tempo para responder as minhas perguntas e dúvidas.

Aos bolsistas de iniciação científica, dos Laboratórios Química Ambiental (LAQAM) e Biotecnologia de Alimentos, que sempre estiveram dispostos a colaborar com os experimentos propostos e por compartilharem vivências tornando esta jornada mais alegre, em especial a Alessandro, Bernardo, Elen Elton, Mateus, Naionara, Raquel e Victor.

Aos professores Rogério Marcos Dallago, Ilizandra Fernandes e Alexander Junges, pelas contribuições durante a realização dos seminários.

À URI- ERECHIM, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho. À CAPES pela concessão de bolsa e apoio financeiro. E, por fim, a todos

que não citei, mas que de alguma forma contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

*Dedico esta conquista em especial aos
amores da minha vida: meu esposo Edimar,
meus filhos Tailine e Bruno.*

“Lembre-se de olhar para o alto, para as estrelas, e não para baixo, para seus pés. Tente achar sentido no que vê e pergunte-se a razão da existência do universo. Seja curioso. Por mais difícil que a vida possa parecer, há sempre algo que você pode fazer e ser bem sucedido. O que importa é não desistir.”

Stephen Hawking

“Todas as coisas são possíveis àquele que crê”

Mc 11:23

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi imobilizar a Lipase AK de *Pseudomonas fluorescens in situ* em suporte zeolítico mesoporoso (MCM-48). Para tanto, foi utilizado o líquido iônico (1-hexadecil-3-metilimidazólio) como direcionador de estrutura (MCM-48) e aditivo de imobilização para a formação das estruturas nanoméricas do MCM-48. O processo de imobilização foi avaliando através do rendimento, o qual apresentou rendimento de 664%. A influência da concentração de líquido iônico (LI) e da enzima utilizados no processo de imobilização foram estudados com o emprego da técnica de planejamento de experimentos com medida de atividade de esterificação do imobilizado. Um DCCR 2² completo, variando a concentração de enzima de 0,059 a 0,341g e de líquido iônico (LI) de 1,27 a 3,528g foi realizado, e com o tratamento dos dados pode-se verificar efeito negativo para a concentração de LI e positivo para a concentração de enzima. Então, um novo DCCR 2² completo foi realizado, deslocando os níveis de LI de 0,472 a 2,728g e de enzima de 0,159 a 0,441g, a máxima atividade do imobilização (578U/g) foi obtida no ensaio 8 (1,6g de LI e 0,441g de enzima). O imobilizado obtido no ensaio 8 foi utilizado para a avaliação da estabilidade de estocagem, reacional e térmica, bem como para a potencial aplicação em reações de síntese de ésteres. O imobilizado apresentou estabilidade reacional em 40°C e 40 min, com atividade de 600U/g, já para a estabilidade operacional foi observado 4 ciclos de reuso com atividade residual de 50 %. Realizou-se testes de aplicação do imobilizado em síntese dos ésteres geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila, os quais apresentaram 14, 18, 3, 2% de rendimento de conversão, respectivamente. Os resultados demonstram a potencialidade do imobilizado especialmente para o oleato de etila.

Palavras-chave: Lipase AK. Zeólita. Líquido iônico. Ésteres.

ABSTRACT

The objective of the present study was to immobilize the Lipase AK of *Pseudomonas fluorescens* in situ in mesoporous zeolitic support (MCM-48). For this purpose, the ionic liquid (1-hexadecyl-3-methylimidazolium) was used as the structure driver (MCM-48) and immobilization additive for the formation of the nanomaterial structures of the MCM-48. The immobilization process was evaluated through the yield, which yielded 664% yield. The influence of the concentration of ionic liquid (LI) and the enzyme used in the immobilization process were studied using the technique of experiment planning with measure of immobilized esterification activity. A complete 2^2 DCCR, varying the enzyme concentration of 0.059 to 0.341 g of ionic liquid (LI) of 1.27 to 3.528 g was carried out, and with the treatment of the data a negative effect could be verified for the concentration of LI and positive for the concentration of enzyme. Then, a new complete 2^2 DCCR was performed, shifting the LI levels from 0.472 to 2.728 g of enzyme from 0.159 to 0.441 g, the maximum immobilization activity (578U / g) was obtained in Test 8 (1.6g LI and 0.441 g of enzyme). The immobilized obtained in the test 8 was used for the evaluation of the storage stability, reaction and thermal, as well as for the potential application in reactions of ester synthesis. The immobilized showed reactivity stability at 40°C and 40 min, with activity of 600U / g, and for operational stability 4 cycles of reuse with residual activity of 50% were observed. Assay application tests were performed on the synthesis of the geranyl oleate, ethyl oleate, butyl butanoate and butyl oleate esters, which had 14, 18, 3, 2% conversion yield, respectively. The results demonstrate the potentiality of the immobilized especially to the ethyl oleate.

Keywords: Lipase AK. Zeolite. Ionic liquid. Esters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Principais métodos para imobilização de enzimas.....	20
Figura 2 - Ilustração da estrutura MCM-41, MCM-48 e MCM-50	23
Figura 3 - Esquema geral da reação de esterificação	27
Figura 4 - Síntese do Líquido Iônico cloreto 1-hexadecil-3-metilimidazólio [C16MI]Cl	31
Figura 5 - Esquema da síntese do suporte MCM-48.....	32
Figura 6 - Difratoformas de raios X das amostras sintetizadas com diferentes quantidades de NH ₄ OH, (a) 12mL, (b) 6mL, (c) 3mL e (d) síntese do derivado imobilizado contendo 3mL de NH ₄ OH e enzima lipase AK	41
Figura 7- Aspecto visual do suporte MCM-48 formado com utilização de líquido iônico	42
Figura 8 - Difratoformas de raios X das amostras: (a) MCM-48 com enzima e (b) MCM- 48 sem enzima	43
Figura 9 - Isotermas de adsorção/dessorção de N ₂ de amostra de MCM-48 com e sem enzima.....	45
Figura 10 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no DCCR2 ² para imobilização de lipase AK em zeólita MCM-48	47
Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de líquido iônico e enzima na atividade de esterificação do imobilizado	51
Figura 12 - Estabilidade de estocagem do imobilizado em MCM-48.....	53
Figura 13 - Estabilidade reacional da enzima livre (a) e imobilizada (b) quanto a atividade de esterificação	55
Figura 14 - Número de ciclos da enzima lipase AK imobilizada em MCM-48 com reuso contínuo.....	57
Figura 15 - Síntese dos ésteres de geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila com a enzima AK imobilizada em MCM-48.....	58
Figura 16 - Estudo cinético da aplicação de lipase AK livre (a) e imobilizada em MCM- 48 (b) na síntese do éster oleato de etila	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aplicações industriais de lipases AK	18
Tabela 2 - Variáveis e níveis utilizados no 1º planejamento DCCR 2 ² completo para imobilização de lipase em zeólita MCM-48	34
Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no 2º planejamento DCCR 2 ² completo para imobilização de lipase em zeólita MCM-48	34
Tabela 4 - Atividade de hidrólise e esterificação da enzima lipase AK livre e imobilizada e do suporte	41
Tabela 5 - Matriz do 1º planejamento DCCR 2 ² completo para a imobilização lipase AK em zeolita MCM-48 em função das variáveis estudadas, concentração de líquido iônico [Li] (g) e concentração de enzimas [E] (g)	46
Tabela 6 - Matriz do 2º planejamento DCCR 2 ² completo para imobilização lipase AK em zeolita de acordo com as variáveis estudadas, concentração de líquido iônico [Li] (g) e concentração de enzimas [E] (g)	48
Tabela 7 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t(2) do 2º DCCR 2 ² completo para a atividade enzimática de esterificação em função da concentração líquido iônico e massa de enzima.....	49
Tabela 8 - Análise de variância para a atividade enzimática de esterificação do 2º DCCR 2 ² completo em função da concentração líquido iônico e massa de enzima .	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

AE: atividade de esterificação;

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

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

Atv: Atividade;

d: Dias;

DCCR: Delineamento composto Central Rotacional;

DRX: Difração de Raio X;

Eq: Equação;

g: gramas;

h: Horas;

Li: Líquido iônico;

Lipase AK: Lipase AK de *Pseudomonas Fluorescens*;

mg: Miligrama;

Min.: Minutos;

mL: Mililitros;

pH: Potencial de hidrogênio iônico;

R²: Coeficiente de correlação;

RI: Rendimento do imobilizado (%);

Rpm: Rotação por minuto;

TEOS: Tetraetilortosilicato;

U/g: Unidade de atividade por gramas;

[E]: Concentração de enzimas;

[LI]: Concentração de líquido iônico;

%: Porcentagem;

°C: Graus Celsius;

μL: Microlitros.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Lipase AK.....	18
3.2 Imobilização de enzimas.....	19
3.3 Suportes para imobilização de enzimas.....	21
3.3.1 Zeólitas.....	21
3.3.2 Líquido iônico (LI)	25
3.4 Síntese de ésteres	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Enzima.....	30
4.2 Produtos químicos	30
4.3 Síntese do líquido iônico cloreto 1-hexadecil-3-metilimidazólio	30
4.4 Ensaios preliminares de síntese do suporte e de imobilização	31
4.5 Síntese MCM-48 e imobilização <i>in situ</i> da lipase AK.....	31
4.5.1 Rendimento do processo de imobilização	32
4.6 Caracterização do suporte	33
4.6.1 Análise de raios X	33
4.6.2 Análise de área específica	33
4.7 Otimização do processo de imobilização de lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em MCM-48	34
4.8 Determinação da atividade de esterificação	35
4.9 Determinação da atividade hidrolítica.....	35
4.10 Avaliação da estabilidade de estocagem	36
4.11 Avaliação da estabilidade reacional	37
4.12 Avaliação da estabilidade operacional.....	37
4.13 Potencial de aplicação da enzima imobilizada em reações de síntese de ésteres.....	37
4.13.1 Geranil oleato	38
4.13.2 Oleato de etila	38

4.13.3 Butanoato de butila.....	38
4.13.4 Oleato de butila	38
4.13.5 Rendimento das reações de síntese	38
4.13. 6. Estudo cinético da síntese do oleato de etila	39
4.14 Tratamentos estatísticos	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Resultados preliminares.....	40
5.1.1 Caracterização do suporte e do derivado imobilizado	40
5.1.2 Atividade de esterificação e hidrólise	41
5.2 Caracterização do suporte MCM-48 com e sem enzima	42
5.2.1 Análise de raios X	43
5.2.2 Análise de área específica.....	44
5.3 avaliação do processo de imobilização de lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i> em MCM-48	46
5.4 Estabilidade de estocagem	52
5.5 Estabilidade reacional.....	54
5.6 Estabilidade operacional	56
5.7 Potencial de aplicação da enzima imobilizada em reações de síntese de ésteres.....	57
5.7.1 Estudo cinético da síntese do oleato de etila	59
6 CONCLUSÃO	61
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas mais utilizadas a nível industrial está a lipase, que é um excelente biocatalisador para vários tipos de reações (hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação), e apresentando uma elevada especificidade e seletividade (DALLA-VECCHIA et al., 2004; BASSEGODA et al., 2012; SHARMA E KANWAR, 2014).

De acordo com Sigma-Aldrich (2014), a Amano lipase AK obtida de *Pseudomonas Fluorescens*, apresenta pH ótimo em torno de 5,5 a 6,5 e atividade de 20,00U/g, cor bege ou marrom, comercializada na forma de pó.

No entanto, por se tratar de uma enzima livre, a mesma, é suscetível à inativação (por inibição ou desnaturação) por fatores físicos (temperatura, pressão, choque mecânico) ou químicos (interação de compostos com a enzima) (MENDES et al., 2011).

Uma das formas encontradas para minimizar a inativação, e até mesmo eliminar, alguns destes problemas, tornando suas aplicações viáveis industrialmente, é a imobilização, tornando-a mais estável, permitindo a reutilização e facilidade de separação do meio reacional (ZANETTE et al., 2014; GHATTASA et al., 2014)

As técnicas de imobilização, assim como as condições empregadas durante a imobilização (tipo de suporte, natureza do solvente), podem influenciar nas propriedades dos catalisadores imobilizados (CANTONE et al., 2013). No que se refere a suportes, os materiais zeolíticos compostos por sílica e alumínio vem se destacando devido a sua grande área de superfície, tamanho de poro e grupos silanol superficiais (LEE et al., 2009; ZHANG et al., 2014), permitindo ainda ajustes e modificações dependendo do tipo de aplicação (VERNIMMEN et al., 2011).

Na família das M41S (mesoporos) tem-se diferentes estruturas como a estrutura MCM-50 (arranjo lamelar), a estrutura MCM-41 (arranjo hexagonal), e a MCM-48 (arranjo cúbico) (GRECCO et al., 2013).

Outra característica relevante é que os materiais zeolíticos, especificamente o MCM-48, permite a incorporação da enzima *in situ* na etapa de polimerização do suporte, pois esta matriz apresenta estrutura mesoporosa ordenada e característica adsorvente (KUMAR et al., 2001). Além disto, o processo de imobilização em materiais

zeolíticos podem ser melhorado com adição de líquido iônico (LI), pois este pode atuar na formação da estrutura de zeolitas (MIGNONI, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi imobilizar *in situ* a enzima lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* em matriz zeólita MCM-48 utilizando líquido iônico.

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, alguns objetivos específicos foram propostos, a citar:

- Imobilizar a lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* em matriz zeólita MCM-48 utilizando líquido iônico;
- Avaliar o processo de imobilização através do rendimento;
- Verificar a influência de diferentes concentrações de enzima e aditivo (LI) no processo de imobilização *in situ*;
- Caracterizar os imobilizados através da análise de raios X e área específica.
- Avaliar a estabilidade térmica e operacional da enzima livre e imobilizada;
- Verificar o potencial de aplicação do imobilizado em reações de síntese de ésteres (geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item são apresentadas informações acerca dos temas relevantes ao desenvolvimento deste estudo, tais como: lipase AK de *Pseudomonas Fluorescens*, imobilização, suportes, zeólita MCM-48, líquido iônico, bem como aplicações de enzimas em reações de síntese de ésteres.

3.1 Lipase AK

A lipase de *Pseudomonas Fluorescens*, particularmente a AK, tem sido investigada, pois é produzida por um fungo, adaptada a temperaturas próximas a 40°C (TINTOR, 2014), bem como, devido a suas propriedades, como a enantioseletividade (FONSECA et al., 2015, FERREIRA et al., 2014).

De acordo com Sigma-Aldrich, a Amano lipase AK obtido de *Pseudomonas Fluorescens*, apresenta pH ótimo em torno de 5,5 a 6,5 e atividade de 20,00U/g, cor bege ou marrom, comercializada na forma de pó.

A lipase AK tem sido estudada por diferentes grupos de pesquisas e em diferentes processos industriais, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1- Aplicações industriais de lipases AK

Área Industrial	Aplicação	Autores
Alimentos	Emulsificante (Produtos de panificação, lácteos e margarinas).	Pawongrat (2007)
	Ésteres de aroma.	Ferreira et al. (2014)
Biodiesel	Síntese de biodiesel, a partir do óleo vegetal.	Silva (2011); Tintor (2014)
Fármacos	Síntese de compostos bioativos.	Silva e Nascimento (2014)

Fonte: O autor

Além de serem usadas para a produção de biocombustíveis, fármacos e de alimentos, a lipase AK pode ter ampla atuação em outras diferentes indústrias. Para tanto é necessária a realização de pesquisas, que podem resultar em novas técnicas

e novas utilidades da enzima, não somente da lipase AK, mas das enzimas de forma geral, bem como de suas formas de imobilização.

3.2 Imobilização de enzimas

As enzimas, quando presentes em meio líquido, agem como catalisadores homogêneos, isto é, encontram-se solubilizadas. Assim quando usadas de forma imobilizada permitem fácil recuperação e reutilização (CUNHA et al., 2014).

De acordo com os autores Hu et al. (2012), Illanes e Altamirano (2008), Dalla-vecchia et al. (2004) e Ferraz (2014) a imobilização de enzimas é um método amplamente utilizado para conferir características desejáveis para as enzimas, tais como possibilidade de reuso, maior facilidade de controle das reações; facilidade de separação do produto final e em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura; facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência em reator contínuo. Porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.

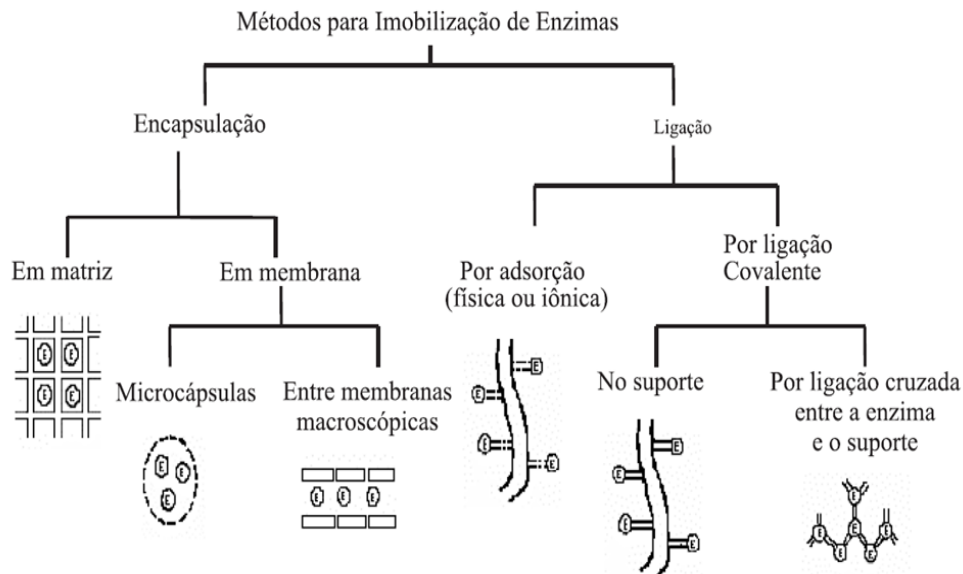
As técnicas e as condições empregadas durante a imobilização, como o tipo de suporte, natureza do solvente e variações de reatores podem influenciar nas propriedades, que podem ser moldadas de acordo com cada tipo de reação (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Na Figura 1, apresentam-se os principais métodos de imobilização.

No processo de imobilização por adsorção ocorre sobre um suporte sólido por ligações fracas, tais como interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas. Este é método mais comum de imobilização (MENDES et al., 2011).

Na imobilização por ligação covalente, a enzima é covalentemente ligada a um material insolúvel, em água, pela reação entre grupos funcionais da proteína e grupos reativos do material ativado. Esta técnica apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Neste caso, são envolvidos os resíduos de aminoácidos não essenciais à catálise enzimática e grupos reativos da superfície do suporte. Entre os grupos funcionais de resíduos de aminoácidos que podem participar da reação encontram-

se: grupos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico; grupos amino da lisina e da hidroxilisina; hidroxila da serina e outros (DALLA-VECCHIA et al., 2004; FERRAZ, 2014).

Figura 1- Principais métodos para imobilização de enzimas



Fonte: DALLA-VECCHIA et al. (2004)

No caso da enzima ser imobilizada por inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. O processo de microencapsulação é muito similar ao de inclusão, embora, neste caso, a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Na microencapsulação cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Como as enzimas são moléculas grandes, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem. A vantagem do uso desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação (MENDES et al., 2011).

Porém, não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, mas um número de características desejáveis comuns deve existir, pois a imobilização ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização e do tipo de suporte (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A imobilização de enzimas torna possível a sua utilização em processos contínuos, como por exemplo, em reatores de leito fixo, onde a enzima imobilizada é mantida no interior do reator enquanto o substrato é constante alcançando, desta forma, maior produtividade (ILLANES E ALTAMIRANO, 2008).

Quando utilizadas as técnicas de imobilização enzimática, busca-se conferir características desejáveis para enzimas. Porém, o tipo de suportes, deve ser considerado, pois estes podem influenciar as propriedades da enzima imobilizada.

3.3 Suportes para imobilização de enzimas

Vários podem ser os suportes para realizar a imobilização enzimática, a natureza física dos mesmos pode variar, desde materiais geliformes (carragena, alginato, álcool polivinílico) até superfícies sólidas (lâminas de aço, pérolas de vidro) (NISHA et al., 2012).

Dentre os diferentes tipos de materiais, utilizados para o processo de imobilização, os mesoporosos são suportes promissores para a imobilização de enzimas devido a sua grande área de superfície, tamanho de poro e presença de grupos silanol superficiais suficiente para modificação da superfície (LEE et al., 2009; ZHANG et al., 2014), dentre os quais encontram-se as zeólitas.

3.3.1 Zeólitas

Com grande variedade de aplicação tecnológica e com capacidade de dessorção reversível de água, as zeólitas foram objeto de estudo de Alex Fredrik Cronstedt, um minerologista sueco, que em 1756, descreveu um novo tipo de mineral, chamado hoje de estilbita, o qual apresentava aspecto espumoso quando aquecido e quando esfriava voltava a hidratar. Estes materiais no momento que são aquecidos liberam água e quando esfriam absorvem água, devido a esta característica de absorver e dessorver água foi chamada de zeólita e seu nome deriva das palavras gregas “zeo” e “lithos” que significa “ferve” e “pedra” ou seja, “pedra que ferve” (GUISNET et al., 2004; VIEIRA, 2014).

A síntese de zeólita normalmente ocorre em condições hidrotermais, consistindo na cristalização de um composto a partir de uma substância nutriente

(amorfa ou cristalina), na presença de água e de um agente mineralizante. As temperaturas na faixa de 25°C a 300°C e sua natureza é definida por fatores cinéticos. Podem ser sintetizadas diferentes estruturas zeólitas ou ainda a mesma zeólita com diferentes composições químicas, fazendo variar a composição das soluções de síntese e as condições operacionais (SIMÕES et al., 2011).

Zeólitas são aluminossilicatos cristalinos, geralmente contendo alcalinos e alcalinos terrosos como contra íons (principalmente Na, K, Mg e Ca). A formação em redes cristalinas tridimensionais, de tetraedros do tipo SiO_4 e AlO_4 unidos nos vértices através dos átomos de oxigênio, são montados em unidades de construção secundários que podem ser poliedros simples, tais como cubos, prismas hexagonais ou cubo - octaédrico. O quadro final da estrutura consiste na ligação de unidades secundárias (FLANIGEN et al., 2010).

Através de estudos tem-se atualmente a denominação das zeólitas a partir do tamanho de poro e dimensão de comprimento de sua estrutura. De acordo com a nomenclatura da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) os materiais porosos podem ser classificados de acordo com a largura dos poros: microporosa (diâmetro dos poros < 2 nm), diâmetro mesoporosos (poros 2-50 nm) e estruturas macroporosas (diâmetro dos poros > 50 nm). Diferentes comunidades científicas, apresentam interesse nesses materiais, devido a diversidade de estruturas de nanoporos, e por apresentarem a possibilidade de ajustes e modificações dependendo do tipo de aplicação (VERNIMMEN et al., 2011).

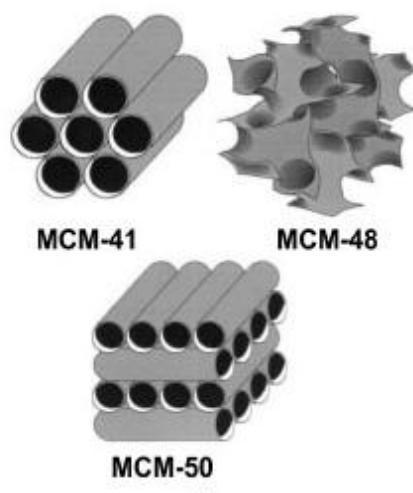
Os silicatos porosos constituem a família de matérias mesoporosos inorgânicos que possuem estrutura de poro aberto e grande área superficial. E estas características os tornam adequados para a aplicação industrial e científica, como catálise heterogênea, processos de separação, controle de poluição ambiental, adsorventes, entre diversas outras (DAI et al., 2010).

Tem-se diversas estruturas zeolíticas mesoporosas dentre as quais estão as estruturas MCM-41, MCM-48 e MCM-50, que fazem parte da família M41S. (GRECCO et al., 2013) (Figura 2).

As nanoestruturas zeolíticas ou simplesmente nanozeólitas apresentam vantagens em aplicações catalíticas e adsorptivas. Dentre suas utilizações, podemos citar o seu uso em sensores, filmes, diagnósticos médicos e separação de materiais. Além disso, elas também podem ser utilizadas na construção de materiais

estruturados e na síntese de sólidos porosos (TOSHEVA e VALTCHEV, 2005). Considerando as modificações físico-químicas na superfície externa desses materiais, na escala manométrica, outras aplicações podem ser exploradas, tais como o uso das nanozeólitas para a imobilização de enzimas (JI et al., 2008).

Figura 2 - Ilustração da estrutura MCM-41, MCM-48 e MCM-50



Fonte: Adaptada de GRECCO et al. (2013)

Macario et al. (2007) estudaram a reação de transesterificação do óleo de oliva via rota metílica utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada, por adsorção, em zeólitas (Silicalita-1 e ITQ-2), e obtiveram rendimento acima de 90% de ésteres metílicos. Porém, os autores relatam a dificuldade de reuso de enzimas na transesterificação, pelo fato de possivelmente a enzima ter desorvido do suporte durante o processo de operação.

3.3.1.1 MCM-48

Mobil Composition of Matter (MCM) é o nome dado a série de materiais mesoporosos que foram sintetizados pela primeira vez por investigadores da Mobil em 1992. Na família das M41S tem-se diferentes estruturas como a estrutura MCM-50, que possui um arranjo lamelar constituído por uma camada dupla do surfactante alternada por camadas de sílica. Já estrutura MCM-41 é formada por um arranjo hexagonal de mesoporos uniformes e unidimensionais, enquanto a MCM-48

possui um arranjo cúbico de mesoporos interconectados, resultando em um sistema de poros tridimensional (GRECCO et al., 2013).

As estruturas zeólitas podem ser usadas para desalinizar água, Jeong (2007), estudou um novo conceito de polimerização interfacial de nanocompósito de película fina na membrana de osmose inversa por meio de incorporação de nanopartículas de zeólita na camada de película fina de poliamida. A permeabilidade à água das membranas de osmose inversa foi melhorada sem qualquer mudança significativa na rejeição de sal. Liu et al (2016) utilizando técnica similar e zeólita MCM-48 incorporada a membrana, obteve fluxo de água nas membranas aumentada continuamente com o aumento do teor de MCM-48, já a rejeição das membranas foi superior quando utilizado menor proporção de MCM-48.

Observa-se na literatura utilizações da MCM-48 para desalinizar água, porém até o presente momento não foram encontrados relatos de MCM-48 para imobilização enzimática.

De forma geral, quando se trata de imobilização de enzimas e formação do suporte, pode-se utilizar modificadores no caso de suportes de sílica, as modificações superficiais podem ocorrer com introdução de vários grupos funcionais tais como: alquila, amino, carboxila, tiosila, dentre outros (ZOU et al., 2014). Estes modificadores podem ser adicionados ao suporte antes da imobilização, com a utilização de diferentes aditivos como polietilenoglicol - PEG, álcool polivinílico - PVA, caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos (SOUZA et al., 2013).

Naringinase foi imobilizada em matriz mesoporosa de sílica MCM-41 através de adsorção com glutaraldeído e utilizados para diminuir o sabor amargo da uva. K_m (constante de afinidade) valor da naringinase imobilizada foi menor do que a de naringinase livre. Os catalisadores imobilizados mostraram uma excelente estabilidade de armazenamento e estabilidade térmica e pode ser reciclado 6 vezes e reteve cerca de 44,57% atividade (LEI et al., 2011).

Lipase de *Candida rugosa* foi ligada ao suporte, de nanocompósito Fe_3O_4 /MCM-41, utilizando glutaraldeído como um reagente de reticulação. Os resultados mostraram que as nanopartículas de magnetita foram revestidas com a sílica MCM-41 com a formação de materiais estruturados de reticulação, e a lipase foi imobilizada com sucesso no suporte. O desempenho catalítico da lipase ligada foi testado na

interesterificação de banha e óleo de soja. Foi demonstrado que a lipase imobilizada apresentou uma melhor atividade catalítica para a reação de interesterificação. O ponto de fusão de deslizamento do produto final era inferior ao da mistura original e a interesterificação conduziu a uma variação óbvia na microestrutura do produto (XIE; ZANG, 2016).

Os processos de imobilização possuem algumas vantagens em relação a enzima livre, porém estas vantagens podem ser melhoradas quando adicionado de aditivo, como exemplos, alguns líquidos iônicos.

3.3.2 Líquido iônico (LI)

Segundo a literatura, um dos primeiros relatos de síntese de LI foi o composto $[\text{NH}_3\text{Et}]\text{NO}_3$ que apresenta ponto de fusão de 12°C (Welton, 1999). E a partir deste tem-se relatos da utilização de LI como solvente para síntese e para catálise (VASCONCELOS e PIZZUTI, 2012).

Líquidos iônicos são considerados sais fundidos a baixas temperaturas e apresentam características capazes de substituição dos solventes orgânicos voláteis, possuindo grande potencial de aplicação, como aditivo, durante o processo de imobilização (SOUZA et al., 2013). Os líquidos iônicos são compostos inteiramente de íons e possuem enorme potencial de variação de temperatura ambiente e apresentam-se como alternativa a solventes orgânicos tóxicos, perigosos, inflamáveis e altamente voláteis (EARLE et al., 2006).

Devido as suas características têm sido amplamente utilizado na biotransformação enzimática, e podem apresentar-se com diferentes cargas de cátions e de ânions. As suas propriedades físico-químicas, únicas, incluem pressão de vapor praticamente nula, múltiplas interações de solvatação com compostos orgânicos e inorgânicos, excelente estabilidade química e térmica de alta condutividade iônica e grande janela eletroquímica (KOSMULSKI et al, 2004; EARLE et al., 2006).

Os Líquidos iônicos podem atuar como direcionador de estrutura e assim induzir a formação zeolítica específica, promovendo o desenvolvimento da estrutura do material que está sendo formado (MIGNONI, 2012), no caso do Brometo de cetiltrimetilamônio (CTMABr) pode atuar como direcionar de estrutura zeolítica MCM-

48 (Nascimento et al. 2016) e o 1-butil-3-metilimidazólio pode direcionar a estrutura da zeólita TON (Lopes, 2014).

Neste sentido, o líquido iônico cloreto 1-hexadecil-3-metilimidazólio mostra-se com grande potencialidade de ser utilizado na formação destes tipos de materiais, mais especificamente o suporte MCM-48, atuando neste caso como direcionador de estrutura e ou *template*.

Conforme Karout e Pierre (2007), a presença de LIs como aditivos pode influenciar a estrutura da sílica gel, protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima, evitando a desnaturação da enzima pela presença de álcool.

De acordo com Moniruzzaman et al. (2010), os líquidos iônicos têm sido extensivamente usados como meio de reação em campos biocatálise, por apresentar elevada estabilidade e seletividade.

Em comparação com as características observadas em solventes orgânicos convencionais, o uso de enzimas em líquidos iônicos apresenta muitas vantagens, tais como: taxas de conversão elevadas, elevada enântio seletividade, melhor estabilidade da enzima, bem como uma melhor capacidade de recuperação e reciclagem. De acordo com Hu et al. (2012) quando realizaram imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em SBA-15 modificado com diferentes líquidos iônicos foi eficiente para melhoria da estrutura de poros, do fortalecimento das interações enzima superfície e das propriedades do sistema imobilizado (estabilidade térmica e operacional, capacidade de reutilização, estabilidade de armazenamento e estabilidade em solventes orgânicos). No estudo, tanto a eficiência da imobilização, como a melhoria da estrutura do suporte, deve-se também ao microambiente formado pela amina e o LI, mantendo assim a conformação favorável da enzima.

Segundo Hara et al. (2010) o uso como aditivo tem sido sugerido, como o agente capaz de estabilizar enzimas, protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima e/ou pela alteração conformacional ocasionando ativação permanente da enzima.

Zou et al. (2014) realizaram imobilização de lipase pancreática porcina (PPL) em material mesoporoso SBA-15 como a matriz e os líquidos iônicos hidrofílicos de metilimidazólio [MSiIM] + BF⁴⁻ como modificadores, atuando como agente de ligação da enzima com a matriz e obtiveram através da imobilização enzimática, a modificação da estrutura da matriz, sendo que o tamanho de poro e a área de superfície específica

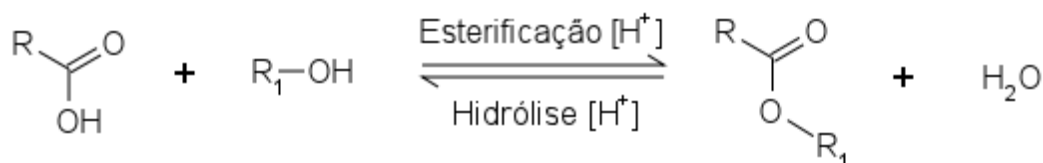
do suporte tornaram-se menores. O resultado demonstrou que a atividade inicial da enzima foi aumentada de 35% para 53%, na presença do Líquido iônico.

3.4 Síntese de ésteres

A síntese de formação de ésteres normalmente ocorre em sistema com teor de água muito baixo, com uso de diferentes solventes ou mesmo em meios sem solvente, e precisam da utilização de um catalisador adequado. Porém, diversos fatores como a natureza do substrato e do solvente, temperatura e quantidade de água afetam a atividade da lipase e influenciam no processo de síntese (REN; LAMSAL, 2017).

A catalise entre um ácido forte e um álcool, formando éster e água na presença de enzima, é chamadas de reações de esterificação (Figura 3), a qual vem sendo considerada outra rota promissora para a obtenção de ésteres de oleato de etila (emulsificantes e biodiesel) e de aromas (*geranil oleato*, *butanoato de butila*, *oleato de butila*). Assim tem-se grande demanda por novos biocatalisadores, principalmente utilizando lipases, em diferentes áreas industriais.

Figura 3 - Esquema geral da reação de esterificação



Fonte: O autor

➤ Aromas

Os aromas podem ser classificados em naturais (obtidos através de métodos físicos, microbiológicos e enzimáticos), sintéticos (processos químicos) e terpênicos (oxifuncionalizados ou terpenoides - responsáveis pelo aroma dos óleos essenciais). A indústria de alimentos está continuamente em busca de sabores únicos com ingredientes de alta aceitabilidade, métodos de processamento e materiais de embalagem. A indústria investe financeiramente na pesquisa e desenvolvimento para o aprimoramento e preservação de sabores, que são delicados e voláteis. A maioria dos compostos aromáticos disponíveis é extraída de fontes naturais ou sintetizada.

Muitos fatores ligados ao aroma afetam a qualidade geral do alimento (GUPTA et al., 2016).

O aroma sugere contato direto e evoca o prazer de comer. As características de um alimento dependem mais do aroma do que apenas do gosto, e ambos, juntos, constituem o sabor ou *flavor* (DUTCOSKY, 2011).

Assim os aromas desempenham um papel essencial em nossa relação com o alimento, os compostos aromáticos possuem importantes aplicações na indústria como flavorizantes, ou seja, substâncias que, quando adicionadas em pequena quantidade aos alimentos, conferem-lhes características degustativas e olfativas (CAVALCANTE et al., 2015).

As funções químicas mais frequentemente encontradas nos aromas são: ésteres, cetonas, alcóois, aldeídos, éteres de fenóis, heterocíclicos nitrogenados, heterocíclicos oxigenados e ácidos carboxílicos, estes são responsáveis pelo aroma se forem apreciados isoladamente (ARAGÃO et al., 2009).

A produção de aromas por via biotecnológica (bioaromas) mostra-se como uma alternativa promissora para atender a grande demanda dos consumidores por uma alimentação saudável, estimulado pelo consumo de produtos naturais e funcionais. Por outro lado, a conscientização da sociedade acerca da importância do desenvolvimento sustentável tem motivado a adaptação dos processos industriais por novas tecnologias que façam uso de micro-organismos (bioprocessos), possibilitando assim, a obtenção de produtos que sejam ambientalmente “amigáveis”. Outro fato de extrema importância é a especificidade de que alguns compostos de aroma opticamente puros só são possíveis de serem produzidos biotecnologicamente, em função da estereoespecificidade apresentada por sistemas biológicos. Atualmente, os compostos de aroma obtidos por via biotecnológica, assim como aqueles extraídos diretamente da natureza, podem ser rotulados como “naturais” (FELIPE, 2015; MOLINA et al., 2013). A aplicação das lipases torna-se mais atraente devido à maior aceitabilidade ambiental quando comparado com a síntese química, ou devido a benefícios econômicos, quando comparados à extração de fontes naturais (CVJETKO et al., 2012).

❖ *Ésteres de Geranil oleato, butanoato de butila, oleato de butila*

Os ésteres geranil oleato (refrescante, doce), butanoato de butila (aroma de morango) e oleato de butila (amêndoas) apresentam papel importante na indústria

farmacêutica, perfumes, polímeros, cosméticos, flavorizantes e estão presentes na indústria de alimentos (SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012).

Para formar o aroma de um produto é necessária a combinação de dezenas de substâncias voláteis representantes de diversas classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas (ARAGÃO et al., 2009). A qualidade característica de alguns produtos, pode estar ligada a um ou mais componentes de seu aroma, mas nenhum constituinte individual é responsável pelo aroma de um alimento.

- Emulsificantes

- ❖ *Oleato de etila*

Na síntese de ésteres de oleato de etila através de enzimas, ocorre pela reação de esterificação do ácido oleico e etanol, produzindo o oleato de etila e água. De acordo com a literatura, esta é uma síntese muito usada na indústria farmacêutica, sendo capaz de atuar como substância solvente de esteroides (NETA et al., 2012).

Os ésteres de oleato de etila, apresentam também propriedades emulsificantes, são surfactantes fortes com grande potencial de aplicação na indústria de alimentos (NETA et al., 2012). Uma das características mais importantes de um surfactante é a sua capacidade para reduzir a tensão superficial na interfaces (MUKHERJEE et al., 2006). Além disso, para aplicações alimentares a indústria de alimentos busca surfactantes fortes e potentes e o éster obtido de oleato de etila apresenta grande potencial como emulsionante (FENG et al., 2009, FERREIRA et al., 2010).

Na indústria alimentícia, é utilizado para aumentar a taxa de secagem e portanto, o aumento da velocidade de secagem de frutos e outros alimentos, tais como raiz de gengibre (DESHMUKH, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentadas as metodologias referentes a síntese do líquido iônico e da MCM-48, assim como a imobilização *in situ* da lipase AK, rendimento do processo, caracterização do suporte, atividade de esterificação e hidrolítica, estabilidade de estocagem, reacional e operacional, além do potencial de aplicação do imobilizado em reações de síntese de ésteres.

4.1 Enzima

A enzima utilizada foi a Amano lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* (Sigma-Aldrich, Brasil/SP).

4.2 Produtos químicos

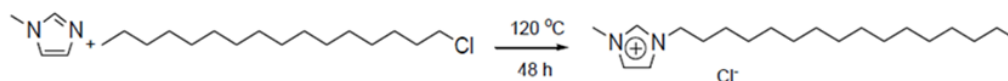
Os produtos químicos utilizados neste trabalho foram: acetato de etila (Vetec 99,5% de pureza); acetona (FMaia); aceto nitrila (Vetec 99,8% de pureza); ácido butírico (Sigma Aldrich); ácido oléico (Sigma Aldrich) álcool butílico (Synth, 99.4% de pureza); álcool etílico (Etanol 95 % Merck); cloro-hexadecano (Sigma Aldrich 95% de pureza); geraniol (Vetec); hidróxido de amônia (Quimex, 28 a 30% de pureza), hidróxido de sódio (Nuclear); metilimidazol (Sigma Aldrich 95% de pureza) e tetraetil ortosilicato (Sigma Aldrich 98% de pureza).

4.3 Síntese do líquido iônico cloreto 1-hexadecil-3-metilimidazólio

O cloreto 1-hexadecil-3-metilimidazólio [C16MI]Cl (Figura 4), foi sintetizado seguindo metodologia descrita por Seuod et al. (2007), com modificações, utilizando-se um balão de 50mL no qual foram adicionados 8,5mL de 1-metilimidazol e 32mL de cloro-hexadecano e 40mL de aceto nitrila. A reação foi conduzida sob agitação magnética de 180rpm e aquecimento de 120°C, durante 48h. Após o término da reação, o balão foi resfriado até a temperatura ambiente, e então foram adicionados 90mL de acetato de etila e a solução foi mantida sob agitação magnética por 5min. Decorrido este tempo, o balão foi levado ao freezer para a precipitação do [C16MI]Cl.

Posteriormente foi deixado resfriar até a temperatura ambiente e a purificação do composto obtido através da extração do acetato de etila (90mL), e ao final do processo o líquido iônico foi seco sob pressão de vapor reduzida. Foram obtidos 32,68 g (93,58mmol) de [C16MI]Cl, num rendimento de 88%.

Figura 4 - Síntese do Líquido Iônico cloreto 1-hexadecil-3-metilimidazólio [C16MI]Cl



Fonte: O autor

4.4 Ensaios preliminares de síntese do suporte e de imobilização

Inicialmente, estudou-se a síntese do suporte MCM-48 sem enzima, afins de comparação posterior com o derivado imobilizado. Durante esta síntese observou-se que a gel formado apresentou pH igual a 13, desta maneira, optou-se então por reduzir o pH através da diminuição de hidróxido de amônia (NH₄OH) para 6ml e posteriormente para 3mL, uma vez que o pH muito alcalino não é um ambiente favorável para a enzima. Neste momento também avaliou-se a quantidade de enzima a ser utilizada nas reações de imobilização (0,1; 0,2 e 0,3 g) e, com os derivados imobilizados, pode-se avaliar a atividade enzimática.

4.5 Síntese MCM-48 e imobilização *in situ* da lipase AK

A síntese da zeolita MCM-48, foi baseada na metodologia de Kumar et al. (2001), com modificações (diminui-se a quantidade de hidróxido de amônia e o CATB foi substituído por líquido iônico), foram diluídos o líquido iônico em g (cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio), de acordo com a quantidade descrita no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2²) (Tabela 2 e 3), em 50mL de água deionizada, então adicionou-se a concentração de enzima em g de acordo com DCCR 2² (Tabela 2 e 3). Após completamente diluído, foram adicionados 50mL de etanol absoluto e 3mL de hidróxido de amônia, 9mL de água deionizada e deixado em agitação de 200 rpm, durante 10 min. Em seguida, foram acrescentados 3,4g de tetraetil ortosilicato-TEOS e deixado sob agitação durante 2h e após foi lavado com água até atingir pH

menor que 8 (para ficar próximo ao pH ótimo da enzima), filtrado a vácuo, seco sob o filtro a temperatura ambiente por 24 h. Após foi pesado e armazenado em embalagens fechadas (Figura 5).

Figura 5 - Esquema da síntese do suporte MCM-48



Fonte: O autor

4.5.1 Rendimento do processo de imobilização

Para calcular o rendimento do imobilizado, considerou-se a atividade total de esterificação da enzima livre no sistema (a qual considera o volume enzimático empregado no ensaio de imobilização e atividade da enzima livre (U/g)) e a atividade total de esterificação presente no imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido e atividade do imobilizado (U/g)) de acordo com a Equação 1.

$$RI(\%) = \frac{ATI}{AAI} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

RI (%) = Rendimento de imobilização;

ATI = atividade enzimática de esterificação total no imobilizado sintetizado;

AAI= atividade adicionada é calculada através da multiplicação da atividade da enzima livre pelo volume adicionado no processo de imobilização (de acordo com cada ensaio dos planejamentos tabela 2 e 3).

4.6 Caracterização do suporte

Com o intuito de caracterizar e avaliar o suporte com e sem enzima foram realizadas as análises de Raios X e área específica.

4.6.1 Análise de raios X

Na determinação dos difratogramas de raios X do suporte, foi utilizado o equipamento difratômetro modelo Miniflex II, da marca Rigaku, utilizado filtro de Ni e radiação Cu-K α ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$), com velocidade de leitura de 10 graus (ângulo 2θ) por minuto. As amostras foram previamente maceradas e armazenadas em temperatura ambiente. Utilizou-se 0,07 g de amostra para realização de cada análise e foram analisados os testes preliminares sem enzima, e as síntese de suporte com redução de NH_4OH (6mL e 3mL), respectivamente. E amostras do DCCR 2² (tabela 6 amostra do ensaio 8 com e sem enzima. Os dados foram analisados através do software Origin.

4.6.2 Análise de área específica

As amostras utilizadas para realização de análises das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram realizadas em equipamento Micromeritics modelo Gemini Vac Prep 061, sem calcinação prévia, porem as amostras sofreram um pré-tratamento a 80 °C por 3h. As amostras utilizadas foram planejamento 2, Tabela 6, amostra do ensaio 8 (com enzima) e sem enzima.

4.7 Otimização do processo de imobilização de lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* em MCM-48

Buscando-se otimizar o processo de imobilização, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional 2² completo (DCCR), variando as concentrações de líquido iônico (g) e enzima (g), conforme apresentado na Tabela 2 e partido dos resultados preliminares onde fixou-se os pontos centrais em 0,2g concentração de enzimas e 2,4g de Li, conforme item 4.4.

Tabela 2 - Variáveis e níveis utilizados no 1º planejamento DCCR 2² completo para imobilização de lipase em zeólita MCM-48

Variáveis independentes		Códigos					Níveis	
			-1,41	-1	0	1	1,41	
Massa de líquido iônico	[LI] (g)	1,27	1,6	2,4	3,2	3,528		
Massa de enzimas	[E] (g)	0,059	0,1	0,2	0,3	0,341		

*Variáveis fixas: Tempo de imobilização (2h)

Fonte: O autor

Em função dos resultados obtidos através do planejamento da tabela 2, um novo DCCR 2² completo foi realizado, deslocando os níveis da concentração de enzima (g) e líquidos iônicos (g), conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no 2º planejamento DCCR 2² completo para imobilização de lipase em zeólita MCM-48

Variáveis independentes		Códigos					Níveis	
			-1,41	-1	0	1	1,41	
Massa de líquido iônico	[LI] (g)	0,472	0,8	1,6	2,4	2,728		
Massa de enzimas	[E] (g)	0,159	0,2	0,3	0,4	0,441		

*Variáveis fixas: Tempo de imobilização (2h)

Fonte: O autor

4.8 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação da lipase foi determinada pela capacidade de síntese do oleato de etila realizada através da reação do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) (5g de substrato). Esta reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada (0,1 g do imobilizado em MCM-48) ou livre (0,1 g) ao meio reacional e a reação foi conduzida a 40°C, 160 rpm durante 40min. Decorrido o tempo, foi retirada alíquota de 500 µL e adicionada em solução de acetona: etanol (1:1 v:v). Os ensaios dos brancos das amostras foram realizados da mesma maneira, porém sem a presença de enzima. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A quantidade de ácido consumido foi determinado por titulação com NaOH 0,05 M até pH 11, como descreve a literatura (FERRAZ et al., 2012).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, calculada pela Equação 2.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 1000 \cdot V_f}{t \cdot m \cdot V_c} \quad (2)$$

Onde:

AE: Atividade de esterificação (U/g);

V_a: Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (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 (min);

m: Massa da enzima livre ou da enzima imobilizada (g);

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

4.9 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade de hidrólise da lipase foi determinada utilizando-se o meio reacional composto de azeite de oliva (10%, p/v) e goma arábica (5%, p/v) em tampão de fosfato de sódio 100mM a pH 7,0. Utilizou-se 19,8 mL desta emulsão e 0,2 g de lipase

(imobilizada ou livre), os quais foram incubados a 40°C, por 40min, 160 rpm. Após a incubação, a reação foi interrompida adicionando-se 15 mL de acetona-etanol (1:1 v/v). O conteúdo de ácidos graxos foi determinado por titulação, até pH 11, com NaOH 0,05 M (ALONSO-MORALES et al., 2008; LIU e CHANG, 2008). Os ensaios de branco foram realizados utilizando-se apenas a emulsão e a solução de acetona-etanol, sem adição de lipase. A definição da atividade hidrolítica da lipase (livre e imobilizada) foi determinada de acordo com a Equação 3.

Uma unidade de atividade enzimática (hidrolítica) foi definida como a quantidade de enzima que libertou 1 umol de ácidos graxo por minuto.

$$AH = \frac{(Va - Vb).M.1000}{t.X} \quad (3)$$

Onde:

AH = Atividade hidrolítica (U/mL ou U/g);

M = Molaridade de NaOH;

Va = Volume de NaOH utilizado na titulação da amostra após a reação (mL);

Vb= Volume de NaOH utilizado na titulação (mL);

X = Volume de enzima(g) ou massa de imobilizado (g) usado na reação;

T = Tempo de reação (min).

4.10 Avaliação da estabilidade de estocagem

Para a avaliação da estabilidade de estocagem o imobilizado com melhor resultado (obtido no ensaio 8, Tabela 6) foi armazenado, a seco, em temperaturas (entre 2 e 5°C) e médias (entre 10 e 25°C). Como resposta acompanhou-se a atividade para a síntese do oleato de etila nas condições descritas no item 4.8 (0,1g do imobilizado). Os ensaios foram realizados periodicamente, considerando a atividade residual (até atingir 50 %) em relação à atividade inicial (100%).

4.11 Avaliação da estabilidade reacional

A estabilidade reacional foi realizada em função do tempo (0, 15, 30, 40, 60, 90, 120, 240 e 360 min) e temperatura (20, 40 e 60°C). A resposta foi expressa em termos de atividade de esterificação (U/g), conforme metodologia descrita no item 4.8 (0,1 g do imobilizado e 0,0317g da enzima livre, proporcional a quantidade de enzima adicionada a síntese do derivado imobilizado otimizado Tabela 6 ensaio 8).

4.12 Avaliação da estabilidade operacional

A capacidade de ciclos reacionais, também conhecida como estabilidade operacional do reuso, dos imobilizados foi avaliada considerando a atividade inicial para síntese do oleato de etila, empregando as condições experimentais descritas no item 4.8. Após cada reação de esterificação (40min) o meio reacional (ácido oleico e etanol) foi removido do sistema com uma micropipeta automática (Transferpette S), e submetido a análise de atividade, enquanto que o imobilizado foi adicionado em um novo meio reacional para uma nova reação (40 min). Este procedimento foi repetido até a atividade residual da enzima atingir 50% da atividade inicial (NYARI et al., 2016).

4.13 Potencial de aplicação da enzima imobilizada em reações de síntese de ésteres

Avaliou-se o potencial de aplicação da lipase AK imobilizada em MCM-48 em reações de síntese dos ésteres geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila.

Os experimentos foram realizados de acordo com metodologia descrita no item 4.8, porém para cada éster foi utilizado um substrato em específico (5g).

4.13.1 Geranil oleato

A quantificação por método indireto, da conversão de ésteres de geranil oleato (ácido oleico: geraniol) (razão molar de 1:3 v:v), foi realizada por titulação de NaOH 0,05M até pH 11, conforme descrito por Paroul (2011).

4.13.2 Oleato de etila

A quantificação por método indireto, da conversão de ésteres de oleato de etila (ácido oleico: álcool etílico) (razão molar de 1:3 v:v), foi realizada por titulação de NaOH 0,05M até pH 11, conforme descrito por Ferraz et al. (2012).

4.13.3 Butanoato de butila

A quantificação por método indireto, da conversão de ésteres de butanoato de butila (ácido butírico: álcool butílico) (razão molar de 1:3 v:v) foi realizada por titulação de NaOH 0,05M até pH 9,4, conforme descrito por Paula et al. (2005).

4.13.4 Oleato de butila

A quantificação por método indireto, da conversão de ésteres de oleato de butila (ácido oleico: álcool butílico) (razão molar de 1:3 v:v) foi realizada por titulação de NaOH 0,05M até pH 9,4, conforme descrito por Nyari et al. (2016).

4.13.5 Rendimento das reações de síntese

Determinação d conversão das reações de síntese: A determinação do rendimento foi realizada segundo Paula et al. (2005), conforme a Equação 4.

$$\%Convers\tilde{a}o = \frac{(AB - Aa)_f}{AB} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

AB = Valor titulado do branco (corresponde ao ensaio sem enzima).

Aa = Valor titulado com enzima presente na amostra.

4.13. 6. Estudo cinético da síntese do oleato de etila

Realizou-se cinética de oleato de etila, devido ao fato do mesmo ter apresentado melhores resultados para a conversão de ésteres. Para a avaliação cinética (tempo de 0 a 360min) da síntese do oleato de etila foram utilizadas as enzimas livre (0,0317g, proporcional a quantidade adicionada a síntese do derivado imobilizado otimizado (Tabela 6 ensaio 8)) e imobilizada (0,1) a diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80°C), sendo o éster de oleato de etila quantificado de acordo com metodologia descrita no item 4.13.5.

4.14 Tratamentos estatísticos

Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxílio do software Statistica versão 5.0, com nível de significância de 95% de confiança.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e discussões referentes a imobilização *in situ* da lipase AK em MCM-48, rendimento do processo, caracterização do suporte, estabilidade de estocagem, reacional e operacional, além do potencial de aplicação do imobilizado em reações de síntese de ésteres.

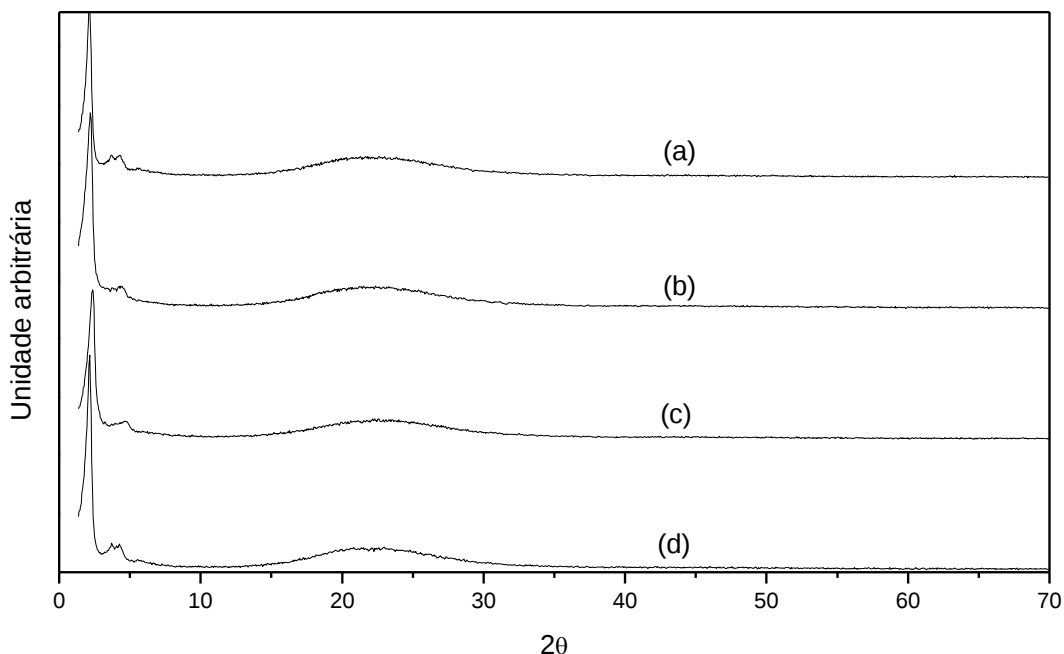
5.1 Resultados preliminares

5.1.1 Caracterização do suporte e do derivado imobilizado

Foram realizadas análises de DRX de amostras de diferentes síntese de suporte sem enzima para avaliar a formação da estrutura MCM-48 e os mesmos foram realizados utilizando 12mL(c), 6mL(b) e 3mL(a) de Hidróxido de amônia (NH_4OH), e uma síntese de 3mL de NH_4OH contendo enzima (Figura 6). Foram realizadas modificações na síntese do suporte utilizando menor quantidade de NH_4OH (6 e 3mL) com o objetivo de deixar o meio menos agressivo perante a enzima. Pois a síntese original deixa o meio em um pH em torno de 13 e com a menor quantidade de NH_4OH o meio apresentou pH 9. Na Figuras 6 a, b e c sem enzima e no gráfico d com enzima verifica-se que foi possível sintetizar MCM-48 com mesma particularidade, apresentando picos característicos de materiais cristalinos, picos na região compreendida entre 2 a 3° (2θ) que é característico de material interno da MCM-48 (CARVALHO et al.2014).

Como foi verificada a formação do suporte utilizando 3mL de NH_4OH e o pH da síntese permaneceu em 9, optou-se por realizar síntese de 3 diferentes suportes variando a quantidade de enzima. Então a partir destes resultados, optou-se por realizar um planejamento (Tabela 2) utilizando no ponto central 0,2g de imobilizado e 2,4g de LI.

Figura 6 - Difratoogramas de raios X das amostras sintetizadas com diferentes quantidades de NH_4OH , (a) 12mL, (b) 6mL, (c) 3mL e (d) síntese do derivado imobilizado contendo 3mL de NH_4OH e enzima lipase AK



Fonte: O autor

5.1.2 Atividade de esterificação e hidrólise

A Tabela 4 apresenta a atividade de hidrólise e de esterificação da lipase AK livre e imobilizada (ao imobilizado foi adicionado 0,2 g de enzima e 2,4g de LI), onde observa-se que a enzima livre apresentou respectivamente 20U/g e 312U/g, enquanto que a imobilizada, nos testes preliminares, apresentou 54U/g e 266U/g, respectivamente.

Tabela 4 - Atividade de hidrólise e esterificação da enzima lipase AK livre e imobilizada e do suporte

	Hidrólise $\pm$ desvio padrão (U/g)	Esterificação $\pm$ desvio padrão (U/g)
Livre	20 $\pm$ 18	312 $\pm$ 13
Imobilizada	54 $\pm$ 12	266 $\pm$ 7
Suporte	0	0

Fonte: O autor

A fim de verificar a possível interferência do suporte na atividade da enzima imobilizada, realizou-se medida de atividade somente do suporte (sem a enzima). É observado ainda, na Tabela 4, que o mesmo não possui atividade de hidrólise e esterificação, confirmando assim que a atividade catalítica está diretamente ligada a enzima. Cabe salientar que todas as amostras foram analisadas em triplicata. Após avaliar estes resultados optou-se por realizar somente a medida de atividade da enzima por esterificação, pois esta apresentou melhores resultados quando comparada com hidrólise. E foram sintetizados mais dois suportes, onde modificou-se a quantidade de enzimas e foi utilizado 0,1 e 0,3g de enzima e os resultados de atividade de esterificação foram de 95 e 319U/g respectivamente. Então foi realizado um planejamento DCCR 2² partindo do ponto central 0,2g de enzima e 2,4 g de LI.

5.2 Caracterização do suporte MCM-48 com e sem enzima

Foram realizadas sínteses de suporte MCM-48 e verificou-se as características do suporte formado. A Figura 7 apresenta o aspecto visual do suporte após a síntese e secagem, na qual pode-se observar a formação da MCM-48 com coloração esbranquiçada.

Figura 7- Aspecto visual do suporte MCM-48 formado com utilização de líquido iônico



(a) após a filtragem

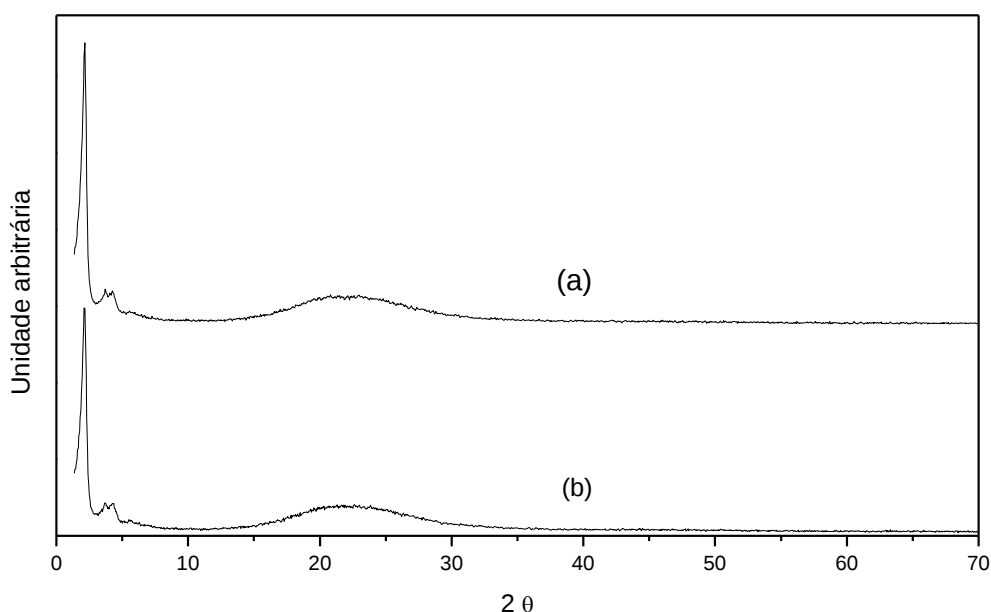


(b) após 24 h de secagem

5.2.1 Análise de raios X

Os difratogramas de raios X (DRX) referentes aos suportes MCM-48 obtidos após a otimização da síntese (Tabela 6 no ensaio 8) com (lipase AK) e sem enzima (Figura 8).

Figura 8 - Difratogramas de raios X das amostras: (a) MCM-48 com enzima e (b) MCM-48 sem enzima



Fonte: O autor

Os materiais apresentaram os picos típicos característicos de MCM-48 e a posição do pico (2θ) identifica a fase obtida como sendo característico do material puro e cristalino MCM-48 (BATTISTON et al 2017), e apresentam estruturas cúbica e hexagonal, semelhante ao que foi encontrado por Nascimento et al. (2014). Observando o difratograma também é possível identificar a formação de um halo entre 20 e 30° (2θ), que é característico de materiais amorfos, sem ordenação cristalina.

5.2.2 Análise de área específica

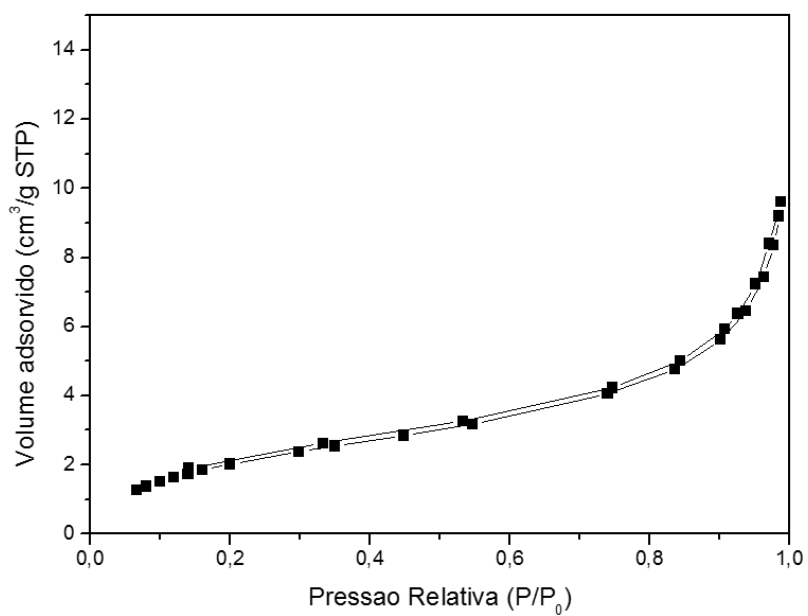
Para caracterização de materiais porosos tem-se diferentes formas. Os métodos baseados na adsorção de gás são os mais convenientes para esse estudo, pois relacionam as medições volumétricas das quantidades de gás adsorvido, a partir de uma ampla gama de pressões relativas, formando curvas formadas entre o volume adsorvido em relação a variação da pressão relativa (p/p_0), a qual é chamada de isoterma de adsorção (TEIXEIRA et al., 2001).

A Figura 9 apresenta as isotermas de adsorção e dessorção de N_2 a 77 K, obtidas para a MCM-48 com adição de enzima e sem adição de enzima. Pode-se observar que foram obtidas isotermas do tipo II, que apresentam um aumento rápido da quantidade de gás adsorvido para valores baixos de pressão relativa, que se torna mais lento para valores intermediários de P/P_0 .

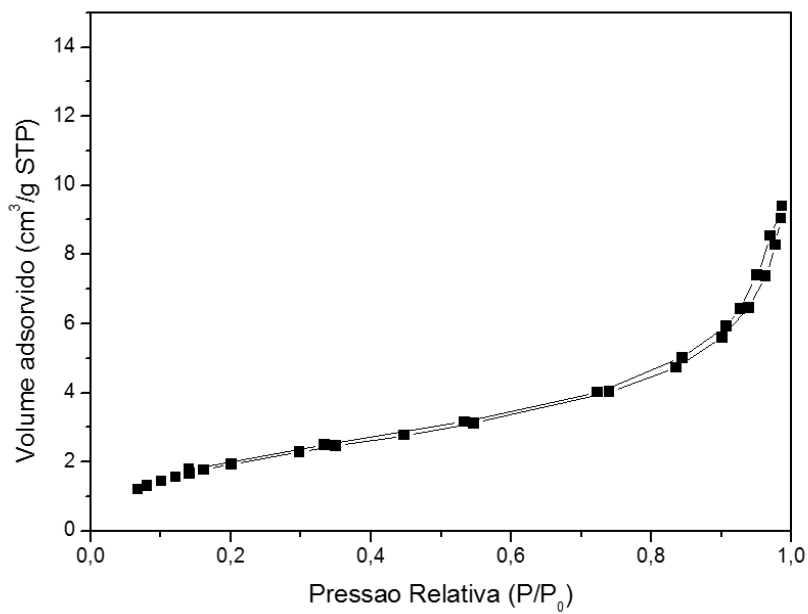
Quanto aos resultados de área específica os mesmos foram de $8,3\text{m}^2/\text{g}$ para a amostra com enzima e de $8,0\text{m}^2/\text{g}$ para a amostra sem enzima, resultados semelhantes de baixo tamanho de área, nas duas amostras. Estes podem ser explicados pelo fato da amostra não ter sido submetida a calcinação e a redução nos valores está relacionada com a presença da enzima e do líquido iônico nos poros do material, ocasionando um preenchimento quase que total dos poros, o que dificulta o acesso do gás aos sítios de adsorção, reduzindo assim os valores de área específica. Resultados semelhantes foram encontrados por Nascimento et al. (2014), que estudaram as características texturais de MCM-48 pura e modificada com níquel.

Por outro lado, estes aspectos podem ser vantajosos pois a possibilidade de dessorção da enzima no meio reacional será pequena ou reduzida.

Figura 9 - Isotermas de adsorção/dessorção de N₂ de amostra de MCM-48 com e sem enzima



(a) MCM-48 com enzima;



(b) MCM-48 sem presença de enzima.

Fonte: O autor

5.3 avaliação do processo de imobilização de lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* em MCM-48

A Tabela 5 apresenta os resultados da atividade de esterificação do imobilizado, em função da massa de enzima (g) e da concentração de líquido iônico (g), do 1º DCCR 2º completo, bem como o rendimento do processo. Na qual observa-se que as maiores atividades de esterificação foram obtidas nos ensaios 3 e 8 com atividade de 602,36 e 597,00 U/g, respectivamente. De acordo com a Tabela 5 pode-se inferir que as variáveis LI e massa de enzima são inversamente proporcionais, ou seja aumentando a massa de enzimas e diminuindo o LI obtém-se resultados satisfatórios o mesmo não acontece quando aumenta-se a quantidade de LI e diminui a massa de enzima. E também podemos observar que nos ensaios 2 e 6 a quantidade de Li utilizada pode ter impedido a atividade enzimática, através de contaminação do li ou até mesmo pela competição do Li com o substrato.

Tabela 5 - Matriz do 1º planejamento DCCR 2º completo para a imobilização lipase AK em zeolita MCM-48 em função das variáveis estudadas, concentração de líquido iônico [Li] (g) e concentração de enzimas [E] (g)

E	[LI]	[E]	ASI	MS	AAI	ATI	RI
1	(-1) 1,6	(-1) 0,1	139,29 ±5,97	1,85	31,26	257,4	823,48
2	(1) 3,2	(-1) 0,1	136,27 ±18,58	3,19	31,26	434,3	1389,42
3	(-1) 1,6	(1) 0,3	602,36 ±11,51	1,10	93,77	663,8	707,88
4	(1) 3,2	(1) 0,3	360,70 ±12,44	2,08	93,77	748,81	798,52
5	(-1,41) 1,27	(0) 0,2	253,24 ±11,87	1,44	62,52	364,17	582,52
6	(1,41) 3,528	(1) 0,2	119,96 ±19,97	2,66	62,52	319,34	510,81
7	(0) 2,4	(-1,41) 0,051	124,32 ±16,06	2,38	18,44	295,63	1603,00
8	(0) 2,4	(1,41) 0,341	597,00 ±12,53	1,93	106,59	1154,6	1083,22
9	(0) 2,4	(0) 0,2	242,20 ±18,47	2,07	62,52	502,08	803,12
10	(0) 2,4	(0) 0,2	252,77 ±7,06	2,05	62,52	519,19	830,50
11	(0) 2,4	(0) 0,2	266,73 ±6,06	1,96	62,52	523,86	837,96

*E: Ensaios; [LI]: Líquido Iônico (g); [E]: Enzima (g); ASI: Atividade do suporte imobilizado (U/g de suporte); MSI: Massa do suporte imobilizado (g); AAI: Atividade adicionada na imobilização (U/g); ATI: Atividade total do imobilizado (U); RI: Rendimento do imobilizado (%).

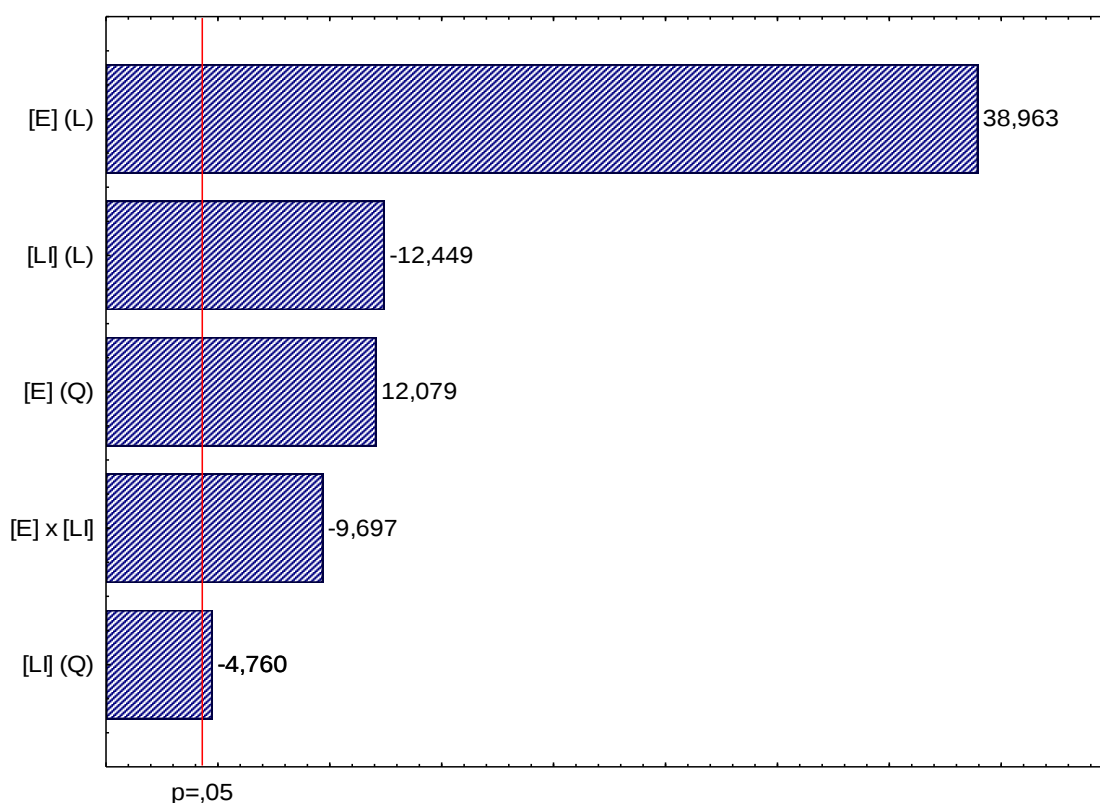
Fonte: O autor

Ao observarmos (Tabela 5) os valores de rendimento de imobilização, o ensaio 7, no qual se utiliza a menor massa de enzima (0,059g) em relação ao suporte (2,38 g), é o que apresenta o maior rendimento (1.603%) do processo de imobilização, indicando um efeito benéfico do processo de imobilização em matriz mesoporosa.

Conforme Levandoski et al. (2015) resultados similares foram encontrados, pois ao utilizar menores proporções de LI obtiveram melhores resultados de atividade de esterificação de 520 U/g para enzima lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) imobilizada em xerogel com líquido iônico.

A Figura 10 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas.

Figura 10 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no DCCR2² para imobilização de lipase AK em zeólita MCM-48



Fonte: O autor

Pode-se observar na Figura 10 que a variável enzima tanto linear quanto quadrático apresentou efeito significativo positivo, ou seja, ao aumentarmos a concentração de enzima no processo de imobilização possivelmente aumentará a

atividade catalítica do imobilizado. Já o LI tanto linear quanto quadrático apresentou efeito significativo negativo, indicando a necessidade da diminuição da concentração deste no processo de imobilização. A interação da enzima com o LI apresentou efeito significativo negativo.

Portanto, como busca-se otimizar as variáveis LI e massa de enzimas em função da atividade de esterificação, e como no 1º planejamento não se obteve os resultados esperados, realizou-se um 2º planejamento DCCR 2² completo deslocando os níveis das variáveis enzima e LI, sendo que a condição do ensaio 3 (1,6g de LI e 0,3g de enzima) do 1º planejamento foi fixada como ponto central do 2º planejamento.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados do 2º DCCR 2² completo, em função da concentração de líquido iônico (g) e de enzimas (g), bem como os resultados em atividade de esterificação e rendimento do processo.

Tabela 6 - Matriz do 2º planejamento DCCR 2² completo para imobilização lipase AK em zeolita de acordo com as variáveis estudadas, concentração de líquido iônico [LI] (g) e concentração de enzimas [E] (g)

E	[LI]	[E]	ASI	MSI	AAI	ATI	RI %
1	(-1) 0,8	(-1) 0,2	164,58 ±18,40	1,16	62,50	190,25	304,33
2	(1) 2,4	(-1) 0,2	126,39 ±12,23	2,08	62,50	263,26	421,11
3	(-1) 0,8	(1) 0,4	387,50 ±23,97	1,06	125,00	411,92	329,45
4	(1) 2,4	(1) 0,4	146,27 ±11,86	1,83	125,00	267,38	213,85
5	(-1,41) 0,472	(0) 0,3	187,40 ±18,27	0,92	93,80	172,41	183,86
6	(1,41) 2,728	(0) 0,3	76,27 ±20,86	1,89	93,80	143,99	153,56
7	(0) 1,6	(-1,41) 0,159	129,95 ±18,61	1,63	49,70	212,09	426,73
8	(0) 1,6	(1,41) 0,441	578,38 ±13,63	1,39	137,80	804,52	583,63
9	(0) 1,6	(0) 0,3	463,87 ±18,65	1,13	93,80	524,63	559,47
10	(0) 1,6	(0) 0,3	500,80 ±13,88	1,12	93,80	560,90	598,14
11	(0) 1,6	(0) 0,3	475,39 ±18,31	1,31	93,80	622,76	664,11

*E: Ensaios; [LI]: Líquido Iônico (g); [E]: Enzima (g); ASI: Atividade do suporte imobilizado (U/g de suporte); MSI: Massa do suporte imobilizado (g); AAI: Atividade adicionada na imobilização (U/g); ATI: Atividade total do imobilizado (U); RI: Rendimento do imobilizado (%).

Fonte: O autor

De acordo com a Tabela 6, observar-se que a maior atividade de esterificação foi no ensaio 8 (578,38 U/g) no qual foi utilizado 0,441g de enzima e 1,6g de LI. Neste

ensaio, também se observa a obtenção da maior massa do suporte imobilizado (1,39g) e valor de rendimento de processo (583,63%) próximo aos maiores valores, indicando um efeito favorável do processo de imobilização em matriz mesoporosa.

Quando utilizadas os níveis extremas de LI (ensaio 5 e 6) fixando a concentração de enzima, observou-se as menores atividades de esterificação (76,27 e 187,4 U/g), fato coerente com o já observado anteriormente no 1º planejamento. Porém quando utilizadas concentração de enzima nas condições extremas (ensaios 7 e 8), fixando a concentração de LI, observa-se a influência da concentração de enzima adicionada ao processo de imobilização, ou seja, quanto maior a concentração utilizada, maior será a atividade catalítica do imobilizado.

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 % ($p < 0,05$). A tabela 8 apresenta a análise de variância para atividade de esterificação.

Tabela 7 - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e $t(2)$ do 2º DCCR 2º completo para a atividade enzimática de esterificação em função da concentração líquido iônico e massa de enzima

Fonte de variação	Coeficiente de regressão	Erro padrão	T	P
Média	480,16	10,91	44,01	0,00
(1)[LI](L)	-54,68	6,69	-8,17	0,01
[LI](Q)	-184,11	7,98	-23,06	0,00
(2h)[E](L)	109,71	6,69	16,40	0,00
[E](Q)	-72,28	7,98	-9,05	0,01
1L by 2L	-50,76	9,45	-5,37	0,03

*[LI]: Líquido Iônico (g); [E]: Enzima (g).

Fonte: O autor

Tabela 8 - Análise de variância para a atividade enzimática de esterificação do 2º DCCR 2² completo em função da concentração líquido iônico e massa de enzima

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	322159,6	5	64431,92	13,24288
Resíduo	24327	5	4865,4	
Falta de Ajuste	23612,8	3	7870,9	
Erro Puro	714,2	2	357,1	
Total	346486,6	10		

R²: 0,96; F tabelado: 3,94

Fonte: O autor

A Equação 5 apresenta o modelo codificado de segunda ordem em função das variáveis concentração de líquido iônico e concentração de enzima. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 7 coeficiente de regressão), na qual obteve-se um coeficiente de correlação de 0,96 e o F calculado 3,36 vezes maior que o F tabelado, os quais permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno, apresentadas na Figura 11.

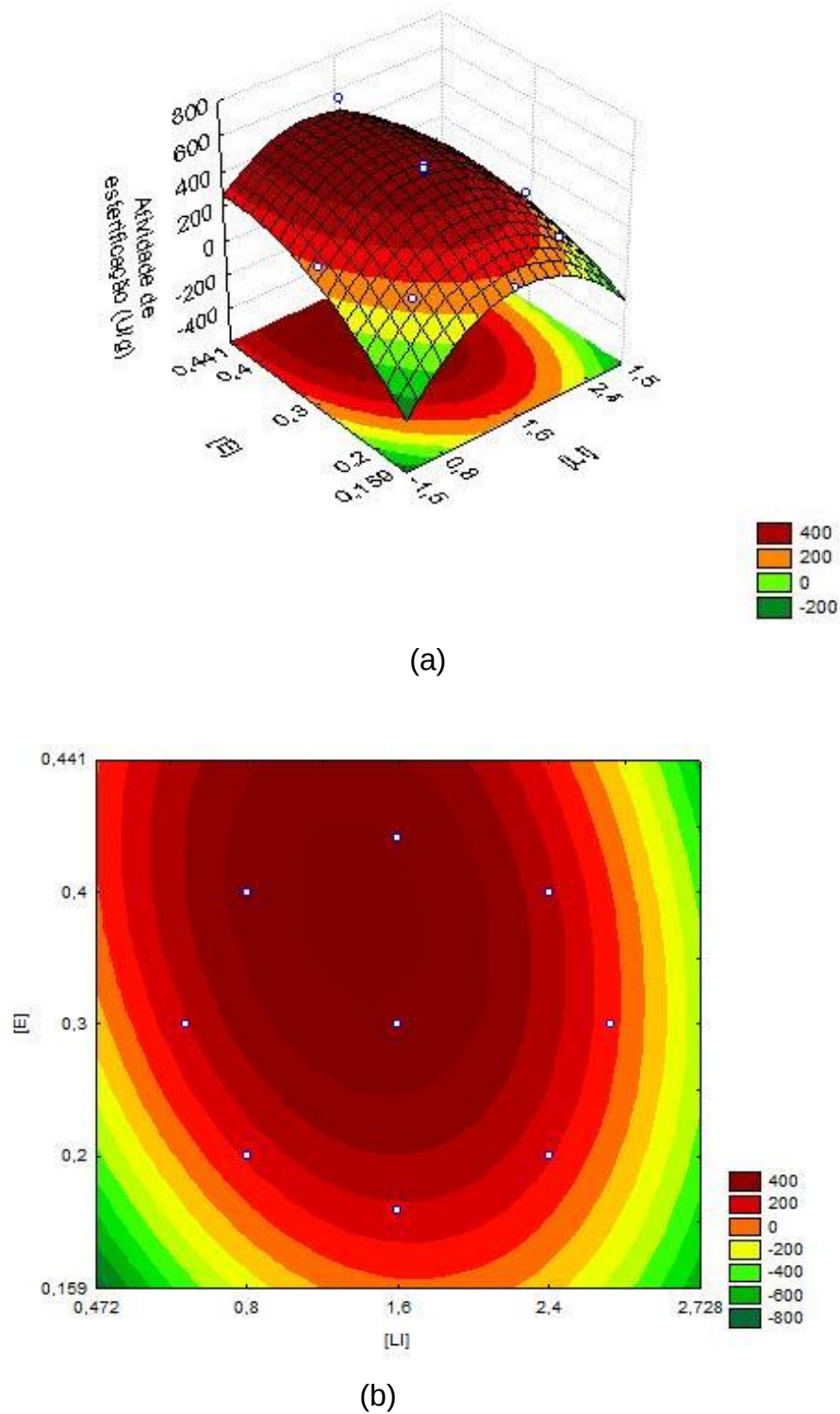
$$\text{Atividade de esterificação} = 80,16 - 54,68 \text{ LI} - 184,11 \text{ LI}^2 + 109,71 \text{ E} - 72,28 \text{ E}^2 - 50,76 \text{ LI} \times \text{E} \quad (5)$$

Onde: [LI]: Líquido Iônico (g); [E]: Enzima (g).

Através da Figura 11 a e b podemos observar que em uma concentração de enzima superior a 0,3g e de LI de 1,6g obtém-se as maiores atividades de esterificação do imobilizado, corroborando com o comportamento observado no ensaio 8 (Tabela 6), que apresentou a maior atividade (578,38 U/g) de esterificação. Este comportamento também pode estar relacionado a estrutura mesoporosa do suporte (zeólitas) e por se tratar de um processo de imobilização *in situ* (enzima adicionada no processo de síntese do suporte). Desta forma, quando uma enzima é imobilizada em um suporte (em matriz) podem acontecer alterações que resultam em ganhos significativos da atividade enzimática e consequentemente ganhos de rendimento. Nas quais podemos citar, a facilidade de interação da enzima com o

suporte, a mudança na conformação enzimática disponibilizando o sítio ativo, além do suporte proteger e melhorar as características de pH e temperatura da enzima.

Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) em função da concentração de líquido iônico e enzima na atividade de esterificação do imobilizado



Fonte: O autor

Outro fator que pode ter contribuído para a maior atividade do imobilizado quando comparado com a enzima livre é a presença do líquido iônico, que conforme Mohidem e Mat (2011), quando utilizado durante o processo de imobilização ou síntese do suporte, possivelmente pode estar modificando a hidrofobicidade do microambiente, exercendo influência no nível de umidade dentro do suporte proporcionando melhores resultados. Resultado similar também foi reportado por Hara et al. (2010), sendo que este afirma que o uso do Li como aditivo tem sido sugerido, como o agente capaz de estabilizar enzimas, protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima e/ou pela alteração conformacional ocasionando ativação permanente da enzima.

Até o presente momento, na literatura não foram encontrados relatos referentes ao processo de imobilização utilizando lipase AK em MCM-48. Porém, foram encontrados relatos utilizando diferentes suportes e diferentes lipases, incluindo a lipase AK.

Marum (2013) em pesquisa de imobilização covalente da lipase AK (0,5g) em quitosana, com a utilização de epicloridrina e magnetita, apresentou atividade de hidrólise de 256 U/g.

Em estudo sobre a lipase de *Bacillus sp.* ITP-001, Carvalho et al. (2015), utilizando o tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor para realizar encapsulamento da enzima pela técnica sol-gel, que foi caracterizada bioquimicamente na reação de esterificação e foi possível verificar uma melhoria do rendimento de atividade (43%), em relação a atividade inicial.

Ao adicionar diferentes líquidos iônicos, durante o encapsulamento pela técnica sol-gel para a imobilização da lipase de *Bacillus sp.* ITP-001, Souza et al. (2013) observaram maior rendimento de atividade para o imobilizado (50%), quando comparado com a livre, possivelmente devido à proteção promovida pelo líquido iônico durante a encapsulação, promovendo proteção da lipase ocasionada pelo álcool e encolhimento de gel durante o processo sol-gel.

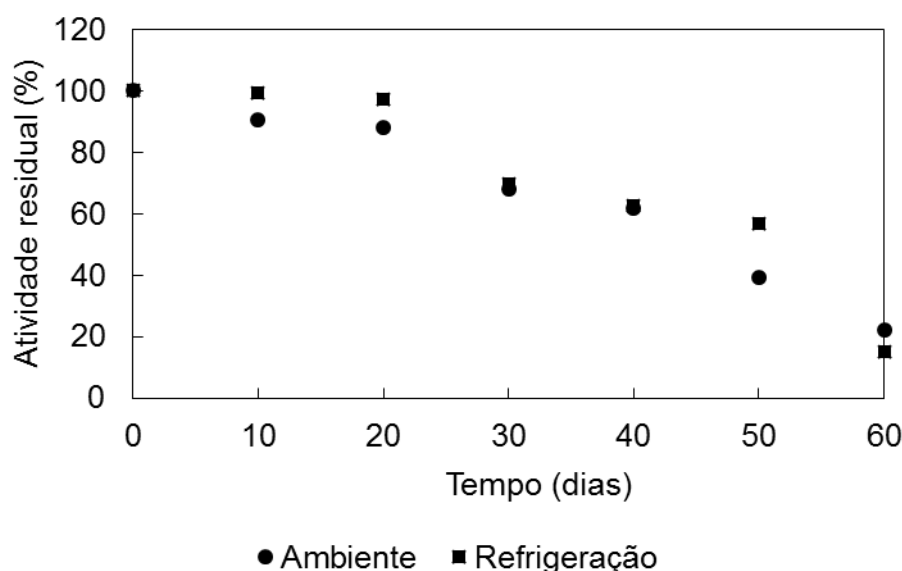
5.4 Estabilidade de estocagem

O estudo da estabilidade de estocagem do imobilizado (obtido no ensaio 8, Tabela 6) foi realizado armazenando-se com o armazenamento do mesmo sob

refrigeração (entre 2 e 5°C) e temperatura ambiente (10 a 25°C). A Figura 12 apresenta os resultados da estabilidade de estocagem, cujos resultados demonstram que tanto a amostra estocada a temperatura ambiente quanto a em geladeira mantiveram 60% da atividade inicial num período de 40 dias. Porém, a amostra mantida sob refrigeração manteve 50% da atividade inicial em 50 dias.

A manutenção de estabilidade do imobilizado pode ser causada pelo aumento da estabilidade do catalisador favorecido pelo líquido iônico ou a própria estrutura do suporte mesoporoso, que favorece a estabilidade do imobilizado.

Figura 12 - Estabilidade de estocagem do imobilizado em MCM-48



Fonte: O autor

Nyari et al. (2016) estudaram a estabilidade de estocagem da lipase CAL B imobilizada em PU, e verificaram que após 375 dias de armazenamento a mesma apresentava atividade residual de 87 % e 51 %, quando armazenadas em temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente.

Giraldo e Díaz (2013) utilizaram a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em organobentonita em pré-tratamento de águas residuais na indústria láctea e obtiveram estabilidade operacional durante 7 dias de armazenamento a 4°C.

5.5 Estabilidade reacional

O estudo da estabilidade reacional é interessante para a aplicação industrial dos biocatalizadores imobilizados e não imobilizados, pois este apresentará as possibilidades de utilização de diferentes tempos e temperaturas, nos quais a reação poderá ser conduzida.

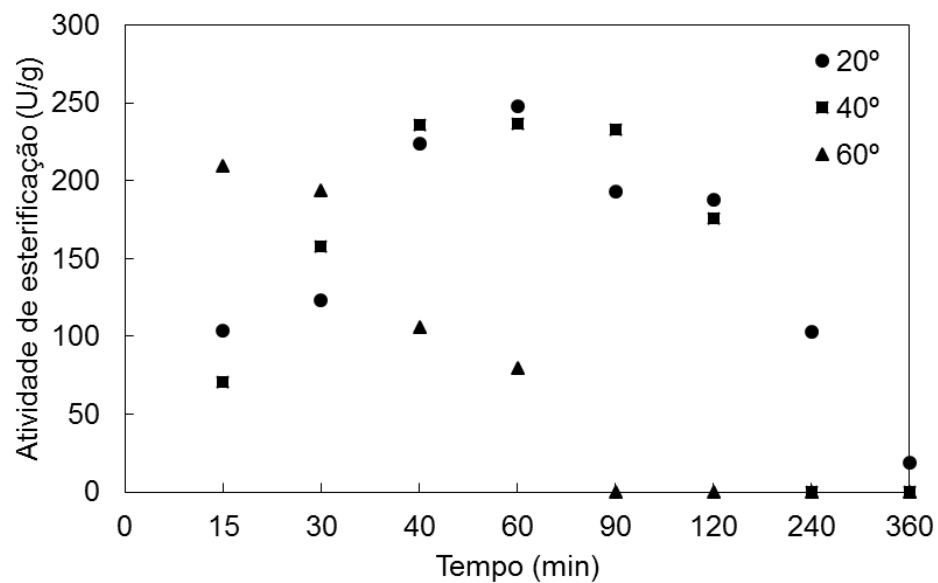
A avaliação da estabilidade reacional, utilizando o imobilizado obtido no ensaio 8, Tabela 6, foi realizada variando-se o tempo de temperatura da reação. As Figuras 13 (a) e (b) apresentam os resultados obtidos com a enzima livre e imobilizada, respectivamente.

A Figura 13 a e b apresentam os valores da atividade de esterificação para a enzima livre e imobilizada em MCM-48, respectivamente, em função do tempo e das temperaturas de reação, no qual podemos observar que em 40 minutos e 40°C reacionais, tanto para a enzima imobilizada como para a livre, ocorre um pico com a maior atividade e esta característica apresenta a possível presença de dois mecanismos reacionais (esterificação e hidrólise) relacionados com as lipases. Do início da reação até os 40 minutos de reação, temos a reação de esterificação, a qual apresenta como produto final o éster e a água. Com o passar do tempo ocorre um aumento da concentração de água no sistema reacional e assim a reação de hidrólise é favorecida e passa a consumir o éster formado, levando a uma diminuição da atividade de esterificação. A tendência de aumentar a atividade em função do tempo pode ser observada em todas as temperaturas testadas.

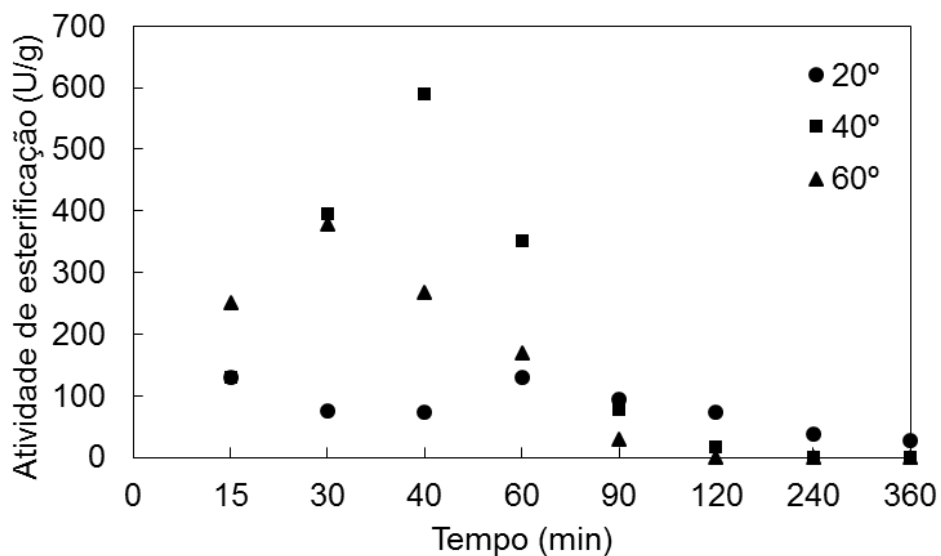
Pode-se observar também nas Figuras 13 a e b que a enzima lipase AK na sua forma imobilizada (b), quando comparada com a livre (Figura 13 a), apresentou melhores atividades e uma maior resistência a mudanças de temperatura e tempo, tanto que na Figura 13 b pode-se inferir que a enzima AK em temperatura de 60°C obteve maior atividade 350U/g em torno de 30 min e a enzima livre atingiu no máximo 200 U/g em igual período. Porém os melhores resultados de atividade para a enzima lipase AK imobilizada foram a 40°C, 600U/g no tempo de 40min e para a livre 40°C, 250 U/g no tempo de 40min. Quando mantida a 20°C a lipase AK Imobilizada em MCM-48 obteve a melhor atividade em torno de 60min atingindo 100U/g de atividade, já a enzima livre mantida na mesma temperatura atingiu 240U/g em 60min. Assim pode-se concluir que a lipase AK imobilizada em MCM-48 e livre, quando submetida

a temperaturas e tempos variados, podem apresentar comportamento diferentes, isto é resultado de a enzima livre ser solúvel e não apresentar proteção física, diferente da imobilizada que apresenta uma estrutura porosa que lhe favorece com proteção estrutural, proporcionando aumento da atividade do catalisador.

Figura 13 - Estabilidade reacional da enzima livre (a) e imobilizada (b) quanto a atividade de esterificação



a) Enzima livre



a) Enzima imobilizada

Fonte: O autor

De acordo com Silva et al. (2011) este comportamento está diretamente ligado a forma estrutural da enzima, pois as enzimas na sua forma solúvel (livre) são moléculas proteicas complexas e de certa flexibilidade, sua atividade catalítica provem uma estrutura altamente ordenada, muito delicada e frágil. Se a molécula absorve muita energia, pode ocorrer mudanças conformacionais nos seus sítios ativos, muitas vezes irreversíveis, podendo até desnaturar totalmente a enzima.

No presente estudo foi observado que a imobilização da lipase AK em MCM-48 aumentou a estabilidade em diferentes temperaturas e tempos e a atividade enzimática quanto a esterificação da enzima imobilizada, quando comparada com a livre. E estes resultados são de extremo interesse pois vão possibilitar a aplicação industrial, já que a literatura apresenta a estabilidade térmica do imobilizado como um requisito importante para garantir a aplicação, pois muitos processos utilizam temperatura na faixa de 40 a 50°C (CARVALHO et al., 2013). Assim deve-se sempre considerar as condições de processo aos quais a enzima imobilizada ou livre serão aplicadas.

5.6 Estabilidade operacional

Ao realizar-se a imobilização de enzimas, um dos principais objetivos é que a enzima imobilizada proporcione a reutilização em mais de um ciclo de reação, buscase o reuso devido ao custo das enzimas, pois em muitos processos, é um dos principais problemas referente a sua aplicação industrial. Normalmente, considera-se que uma enzima pode ser reutilizada até a sua atividade ser maior ou igual a 50 % do valor da atividade inicial (FICANHA, 2014).

Para avaliar a possibilidade de reutilizar a enzima AK imobilizada em matriz MCM-48 (ensaio 8, Tabela 6), esta foi submetida a reuso contínuo (sem lavagem) em reações de síntese de oleato de etila, cujo resultado é apresentado na Figura 14.

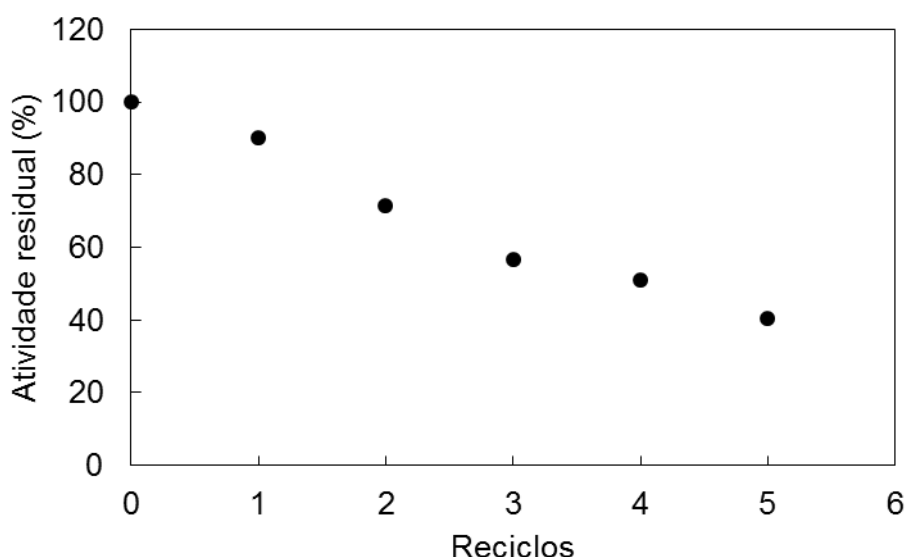
Como pode-se observar na Figura 14 o imobilizado apresentou 4 ciclos com atividade residual de mais de 50%, indicando que ele poderia ser reutilizado em torno de 4 vezes em um mesmo processo reacional para síntese do oleato de etila.

A perda de atividade e/ou eficiência catalítica do imobilizado entre os ciclos é uma tendência esperada em processos catalíticos e pode estar vinculada a diferentes fatores, tais como: i) inativação da enzima por desnaturação da mesma, ii) lixiviação

do suporte e iii) obstrução física do sítio ativo da enzima, os quais podem se manifestar independentemente ou associativamente (Carvalho et al., 2015).

Souza et al. (2013) ao realizar estudo sobre a reutilização da enzima lipase *Bacillus* sp. PTI-001 imobilizada em sol gel, obteve 3 e 2 ciclos com mais 50% de atividade inicial para a lipase imobilizada por adsorção e para a lipase imobilizada por encapsulação, respectivamente. Feher et al. (2008) empregando a CALB imobilizado (Novozym 435) juntamente com líquido iônico (Bmim - PF6) na síntese de acetato de isoamila, verificaram 7 ciclos, com rendimentos próximo de 100%.

Figura 14 - Número de ciclos da enzima lipase AK imobilizada em MCM-48 com reuso contínuo



Fonte: O autor

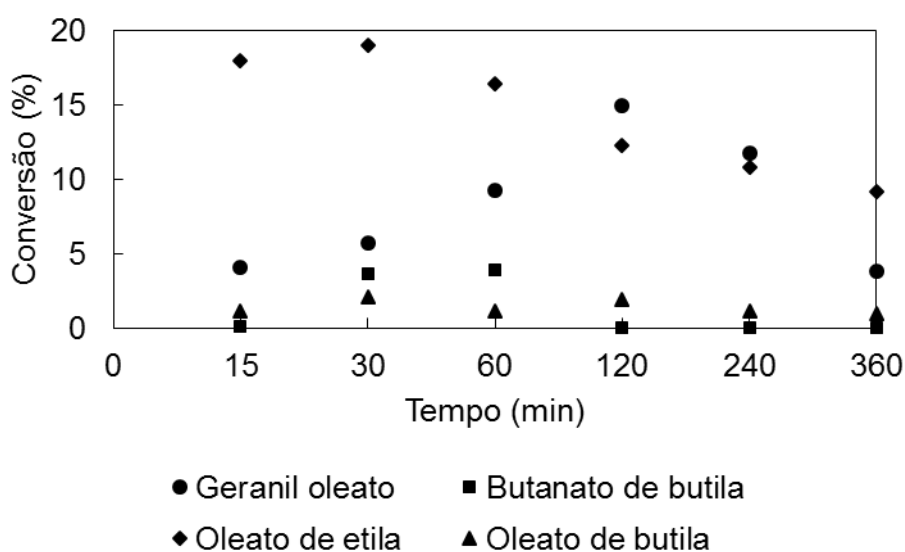
5.7 Potencial de aplicação da enzima imobilizada em reações de síntese de ésteres

Realizou-se ensaios de aplicação da lipase AK imobilizada em MCM-48 (ensaio 8, Tabela 6), na catálise de reações para síntese enzimática dos ésteres geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila, conforme apresentado na Figura 15.

A aplicação do imobilizado nas reações de produção dos ésteres geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila, apresentaram 14, 18, 3, 2% de rendimento de conversão, nos tempos de 120, 30, 60, 30min, respectivamente. Os

resultados demonstram a potencialidade do imobilizado avaliado, principalmente para a síntese do oleato de etila. Percebe-se também que com o passar do tempo, no caso do oleato de etila, até 30 min aumenta a conversão de ésteres e a partir do ponto ótimo de conversão passa a diminuir, o que pode ser causado pela inativação da enzima e a própria conversão de ésteres e água e a reação inversa de hidrólise estar favorecida.

Figura 15 - Síntese dos ésteres de geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila com a enzima AK imobilizada em MCM-48



Fonte: O autor

Conforme Lerin et al. (2011), a perda de atividade da enzima ao longo do tempo pode ser provocada pela desativação da enzima como uma consequência do efeito térmico e concentração do produto. Quanto ao produto da reação de esterificação, que é a água, com seu aumento excessivo ocorreu um efeito negativo no rendimento de conversão e pode ter influenciado diretamente nos valores de conversão dos ésteres (GRAEBIN et al., 2012). Para tanto, o conhecimento da lei de velocidade que rege o processo de desativação muitas vezes é importante nos processos de catálise enzimática e de interesse na concepção do processo.

Em estudo realizado por Nyari (2013), a aplicação do imobilizado (lipase CALB em poliuretano) nas reações de produção de geranil propionato e geranil oleato resultou em conversões de 18,3% e 31,2%, respectivamente, e da síntese de oleato de etila em 83,2%.

Ferraz et al. (2012) ao realizar síntese de geranil propionato obteve conversões de 32,2% e 34,4% quando utilizou extrato enzimático bruto (EEB) e extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI), respectivamente. Já para a lipase comercial de pâncreas suíno, a maior conversão obtida (35,9%) foi quando utilizada a enzima comercial livre (ECL) na esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico.

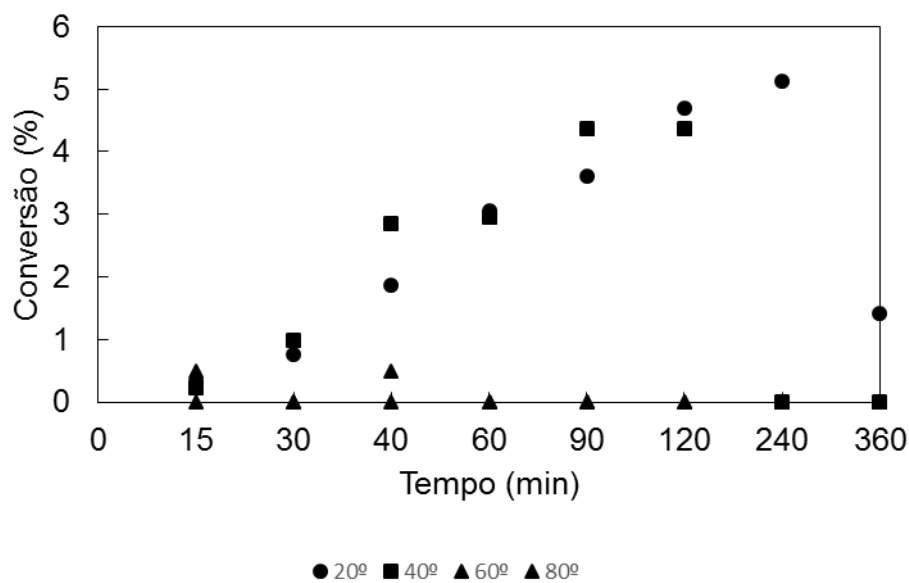
5.7.1 Estudo cinético da síntese do oleato de etila

Os resultados de aplicação demonstram a potencialidade do imobilizado especialmente para o oleato de etila, então realizou-se um estudo cinético de aplicação da enzima lipase AK livre e imobilizada em matriz MCM-48 (ensaio 8, Tabela 6) na síntese do oleato de etila a diferentes temperaturas.

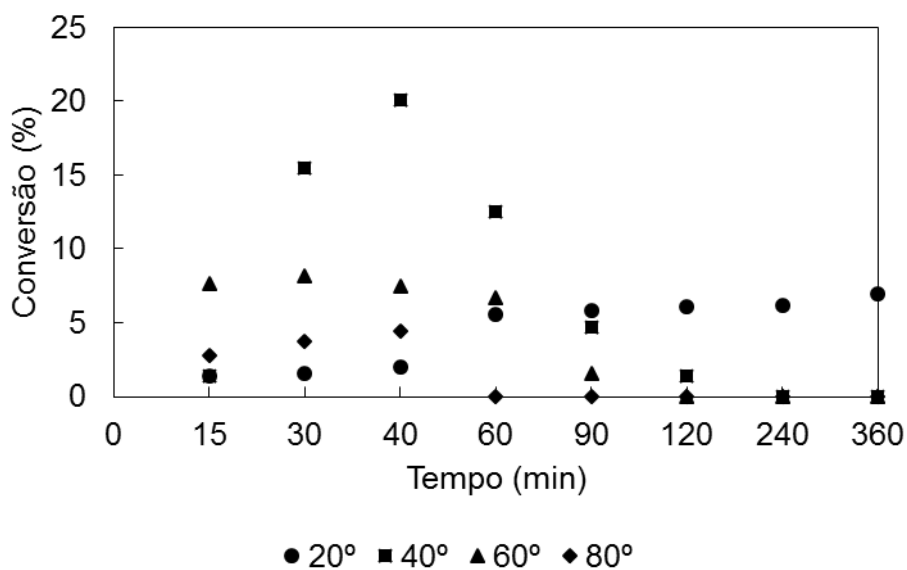
Através da Figura 16 a e b, pode-se observar que a enzima livre (Figura 16 a) atingiu maior conversão (5%) em 240min a 20°C, enquanto que a imobilizada (Figura 16 b), apresentou conversão (20%) em 40°C em apenas 40min. Este comportamento pode estar ocorrendo, pelo fato da enzima imobilizada apresentar maior acessibilidade e contato do sítio ativo com o substrato e este comportamento pode ser proporcionados pelo suporte e pelo líquido iônico.

Ferreira et al. (2014), realizaram imobilização da lipase Amano AK de *P. fluorescens* sobre esferas de fibra de seda e alginato por encapsulação, e puderam observar que a imobilização favoreceu a seletividade da reação em comparação com a enzima livre, quando obtiveram 48% de rendimento para a enzima livre e 49% para a imobilizada (no tempo de 96h), porém com índices de seletividade de 124 e 327 respectivamente.

Figura 16 - Estudo cinético da aplicação de lipase AK livre (a) e imobilizada em MCM-48 (b) na síntese do éster oleato de etila



a) enzima livre



b) enzima imobilizada

Fonte: O autor

Os estudos de aplicação da lipase são de grande importância, pois estas apresentam grande aplicação industrial como por exemplo, reações de biotransformação. A melhoria da eficiência catalítica ocasiona o aumento do valor agregado frente aos princípios da química verde e sustentabilidade (KAPOOR et al. 2012; CARVALHO et al. 2015).

6 CONCLUSÃO

A síntese de imobilização de lipase AK em MCM-48 in situ é inovadora, sendo que existem poucos estudos científicos relatados a esse respeito, a qual apresentou rendimento de 664%, e atividade residual após 40 dias de armazenamento igual 60%.

Um planejamento fatorial completo de segunda ordem possibilitou a maximização do processo de imobilização, a maior atividade 578U/g com 1,6g de LI e 0,441g de enzima.

Os resultados de estabilidade de estocagem demonstraram que tanto a amostra estocada a temperatura ambiente quanto a em geladeira mantiveram 60% da atividade inicial num período de 40 dias. Em relação ao reuso da enzima imobilizada, pode-se verificar a possibilidade de reutilização por até 5 vezes, com atividade residual de mais de 50%.

A aplicação do imobilizado nas reações de produção dos ésteres geranil oleato, oleato de etila, butanoato de butila e oleato de butila, apresentaram 14, 18, 3, 2% de rendimento de conversão, respectivamente.

Desta forma, a imobilização da lipase AK em MCM-48, por confinamento em matriz, é uma técnica promissora, pois o imobilizado alcançou maior atividade quando comparada com a livre, e relacionando a simplicidade do processo a capacidade de aplicação do biocatalizador em processos biotecnológicos em especial em reações de interesse na indústria de alimentos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser apontadas:

- Avaliar a possibilidade de aplicação do imobilizado em emulsificantes;
- Avaliar a possibilidade de aplicação em diferentes ésteres;
- Avaliar a aplicação do imobilizado em tratamento de efluentes;
- Avaliar o efeito da ativação enzimática em alta pressão (CO₂ e GLP) sobre a atividade catalítica da enzima imobilizada;
- Avaliar o efeito do ultrassom na atividade do imobilizado;
- Avaliar o imobilizado em sistema de fluxo contínuo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO-MORALES, N. et al. Reversible immobilization of glutaryl acylase on sephabeads coated with polyethyleneimine. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 533-536, 2008.
- ARAGÃO, V.C. et al. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, p. 2268-2272, 2009.
- BASSEGODA, A.; CESARINI, S.; DIAZ, P. Lipase improvement: goals and strategies. **Computacional and Structural Biotechnology Journal**, v.2, n.3, p. 1-8, 2012.
- BATTISTON, C. S. Z. et al. Immobilization of lipase on mesoporous molecular sieve MCM-48 obtained using ionic solid as a structure director and esterification reaction on solvent-free. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170011>>. Acesso em: 04 mai. 2017.
- CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262-6272, 2013.
- CARVALHO, N. B. et al. 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, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p.399-409, 2015.
- CUNHA, A. G. et al. Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from Candida antarctica effect of the support nature on catalytic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59– 67, 2014.
- CVJETKO, M.; VORKAPIĆ-FURAČ, J.;ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1344–1350, 2012.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**. v. 27, p. 623-630, 2004.
- DAI, W. et al. A mini review on chemical fixation of CO₂: Absorption and catalytic conversion into cyclic carbonates. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v.4, n. 1, p. 163-171, 2010.
- DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: Champagnat, 2013, 531 p.
- EARLE, M. J. et al. The distillation and volatility of ionic liquids. **Nature**, v. 439, p. 831-834, 2006.

FEHÉR, E.; et al. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcohol biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, p. 28–32, 2008.

FELIPE, L. O. **Isolamento e Seleção de Micro-organismos Produtores de Bioaromas por Biotransformação de Terpenos**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável, Universidade Federal de São João del-Rei/Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco, 2015.

FERRAZ, L. I. R. **Aplicação de lipases na catálise de reações de interesse**. 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim. 2014.

FERRAZ, L. R et al. 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.

FENG, J.L. et al. Study on food-grade vitamin E microemulsions based on nonionic emulsifiers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 339, n. 1-3, p.1-6, 2009.

FERREIRA, I. M. et al. Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin–alginate spheres. **Tetrahedron Letters**. v. 55, p. 5062-5065, 2014.

FERREIRA, J. P. et al. Effects of the components of two antimicrobial emulsions on food-borne pathogens. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 227-230, 2010.

FICANHA, M. M. A. **Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B (CalB) pela técnica de sol - gel**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, 2014.

FLANIGEN, E. M.; BROACH, R. W.; WILSON, S. T. **Zeolites in Industrial Separation and Catalysis**. Edited by Santi Kulprathipanja, Copyright © 2010.

FONSECA, T. S. et al. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 492, p. 76-82, 2015.

WELTON, T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 8, p. 2071-2084, 1999.

GHATTASA, N. et al. Purification and improvement of the functional properties of *Rhizopusoryzae* lipase using immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.110, p.111–116, 2014.

GIRALDO, G. G. I.; DÍAZ, R. M. Pre-tratamiento de aguas residuales de la industria láctea con una lipasa inmovilizada. **Producción + Limpia**, v. 8, n. 2, p. 51-59, 2013.

GRAEBIN, N. G. et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. **Biotechnol Progress**, v. 8, p. 406-412, 2012.

GRECCO, S. T. F.; RANGEL, M. C.; URQUIETA-GONZÁLEZ, E. A. Zeólitas hierarquicamente estruturadas. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 131-142, 2013.

GUINET, M.; RIBEIRO, F. R.; VALE, H. **Zeólitos: um nanomundo ao serviço da catálise**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, cap. 1, p. 17-40, 2004.

GUPTA, S. et al. Encapsulation: entrapping essential oil/flavors/aromas in food. **Encapsulations**, v. 2, p. 229- 268, 2016.

HARA, P. et al. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 129-134, 2010.

HU, Y. et al. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2291–2299, 2012.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO C. **Enzymes reactors**. In: Enzyme biocatalysis: Principles na applications. Chile, Springer Netherlands.p.205-251, 2008.

JEONG, B.H. et al. Interfacial polymerization of thin film nanocomposites: a new concept for reverse osmosis membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 294, p. 1–7, 2007.

Jl, J. et al. Enhanced protein digestion through the confinement of nanozeolite-assembled microchip reactors. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 2457-2463, 2008.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v.48, p.1-15, 2012.

KAROUT, A.; PIERRE, A. C. Silica xerogels and aerogels synthesized with ionic liquids. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 353, p. 2900-2909, 2007.

KOSMULSKI, M.; GUSTAFSSON, J.; ROSENHOLM, J. B. Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited. **Thermochimica Acta**, v. 412, p. 47–53, 2004.

KUMAR, D. et al. MCM-41, MCM-48 and related mesoporous adsorbents: their synthesis and characterization. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects**, v.187–188, p. 109-116, 2001.

LEE, C. H.; LIN, T. S.; MOU, C. Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. **Nano Today**, v.4, p. 165–79, 2009.

LEI, S. et al. Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 4096-4099, 2011.

LERIN, L. et al. Successive cycles of utilization of Novozym 435 in three different reaction systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 28(02): p.181-188, 2011.

LIU, L. et al. Effect of MCM-48 nanoparticles on the performance of thin film nanocomposite membranes for reverse osmosis application. **Desalination**, v. 394, p. 72-82, 2016.

LIU, C. H.; CHANG, J. S. Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous *Burkholderia sp.* C20. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 1616-1622, 2008.

LEVANDOSKI, K. L. D. et al. Imobilização da lipase cal b em xerogel obtido pela técnica sol-gel utilizando líquido iônico como aditivo. **Perspectiva**, Erechim, v. 39, n.147, p. 51-60, 2015.

LOPES, C. W. **Síntese de zeólitas tipo ton utilizando um sal de imidazólio como agente direcionador de estrutura**. 2014, 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2014.

MACARIO, A. et al. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, 328-335, 2007.

MARUM, D. S. **Biocatalisadores magnéticos a partir de quitosana**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos dos Goytacazes, 2013.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

MIGNONI, M. L. **Zeólitas obtidas com líquido iônicos como direcionadores de estrutura: Síntese e reatividade**. 2012. 168 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 295–314, 2010.

MOHIDEM N. A.; MAT H. B. Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol-gel silica with additives. **The Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 61, p. 96-103, 2011.

MOLINA G. et al. In: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; MARÓSTICA Jr., M. R. *Biotecnologia de Alimentos*. Primeira Edição. Editora Atheneu, 2013. Cap. 11.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

NASCIMENTO, A. R. et al. Síntese e caracterização de materiais mesoporosos modificados com níquel para a captura de CO₂. **Cerâmica**, v. 60, p. 482-489, 2014.

NETA, N. S. et al. Produção enzimática do ester oleato de etila utilizando lipase a partir de *Candida antarctica* B. **Holos**, v. 2, 2012.

NYARI, N. L. D. **Estudo da imobilização de lipase de *Candida antarctica* b em poliuretano**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, 2013.

NYARI, N. L. D. et al. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52-61, 2016.

NISHA, S.; ARUN, K.; GOBI, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, p. 148-155, 2012.

PAROUL, N. **Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico**. 2011. 131 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, 2011.

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.

PAWONGRAT, R.; Xu, X.; H-Kittikun, A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. **Food Chemistry**, v. 104, p. 251-258, 2007.

REN, K.; LAMSAL, B. P. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. **Food Chemistry**, v. 214, p. 556-563, 2017.

SEOUD, O. A. E. et al. Synthesis and micellar properties of surface-active ionic liquids: 1-Alkyl-3-methylimidazolium chlorides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 296-304, 2007.

SHARMA, S; KANWAR, S. S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications, Review Article, **Scientific World Journal**, v. 2014, 15 pages, 2014.

SIGMA-ALDRICH, Ficha de informações de produtos químicos. Versão 5.4, 2014.
SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SIMÕES, A. N. et al. Estudo da influência dos parâmetros de síntese na obtenção de zeólitas. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, p. 35-38, 2011.

SOUZA, R. L. et al. Líquido iônico prótico como aditivo na imobilização da lipase utilizando sílica sol-gel. **Enzima microbiana e Tecnologia**, v. 52, p. 141-150, 2013.

SILVA, G. S. et al. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum**. Technology Maringá, v. 33, n. 2, p. 197-203, 2011.

SILVA, J. M. R.; NASCIMENTO, M. G. Epoxidação do β -cariofileno com lipases imobilizadas em gel de ágar. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1022-1027, 2014.
TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. V.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

TINTOR, C. B. **Utilização de resíduos gordurosos para a produção de biodiesel via enzimática**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

TOSHEVA, L.; VALTCHEV, V. P. Nanozeolites: Synthesis, crystallization mechanism, and applications. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 2494-2513, 2005.

VASCONCELOS, S. N. S.; PIZZUTI, L. Síntese do Líquido Iônico Hexafluorofosfato de 1-Butil-3-Metilimidazólio [BMIM][PF₆]. **Revista Ceciliana**, v. 4, p. 90-93, 2012.

VERNIMMEN, J.; MEYNEN, V.; COOL, P. Synthesis and catalytic applications of combined zeolitic/mesoporous materials. **Beilstein J Nanotechnol**, v. 2, p. 785–801, 2011.

VIEIRA, L. H. **Substituição isomórfica de íons gálio em zeólitas de estrutura MFI para modificação da acidez do catalisador e controle da desativação na desidratação do glicerol**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2014.

XIE, W.; ZANG, X. Immobilized lipase on core–shell structured Fe₃O₄–MCM-41 nanocomposites as a magnetically recyclable biocatalyst for interesterification of soybean oil and lard. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1283-1292, 2016.

ZANETTE, A.F.; AWADALLAK, J.; FILHO, L.C. Immobilization of lipases regiosseletivas dies in sol-gel and partial hydrolysis reaction. **Journal of Exact Sciences**, v.3, p.05-08, 2014.

ZHANG, F. et al. Thin-layer polymer wrapped enzymes encapsulated in hierarchically mesoporous silica with high activity and enhanced stability. **Scientific report**, n. 4221, 2014.

ZOU, B. et al. Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. **Applied Surface Science**, v. 311, p. 62–67, 2014.