

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

**TUANY CAMILA HONAISSER**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*)  
UTILIZANDO A TÉCNICA SOL-GEL**

**ERECHIM, RS – BRASIL**

**ABRIL DE 2017**

**TUANY CAMILA HONAIER**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*)  
UTILIZANDO A TÉCNICA SOL-GEL**

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

Orientadores: Prof. Dra. Natália Paroul  
Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni

**ERECHIM, RS- BRASIL  
ABRIL, 2017**

Estudo da imobilização da lipase NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*) utilizando a técnica sol-gel

Tuany Camila Honaiser

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

Comissão Julgadora:

---

Profa. Dra. Natália Paroul / URI –Erechim  
(Orientadora)

---

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

---

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago / URI-Erechim

---

Dra. Ilizandra Aparecida Fernandes/ URI-Erechim

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Andressa Sausen de Freitas / IFRS - Erechim

Erechim, 28 de abril de 2017.

“A educação é a arma mais poderosa que  
você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

## **AGRADECIMENTOS**

Gratidão à Deus pela vida, pela força, pelas oportunidades. Sem Ele eu não seria nada.

Aos meus pais Osmar e Haide, pelo incentivo, pelo amor, por estarem sempre ao meu lado me ajudando em todos os momentos.

A minha irmã Natani, pelo amor, amizade e apoio.

A dinda Adelaide e ao Marcos, pelo carinho, incentivo e auxílio de sempre.

Aos meus orientadores Natália Paroul e Marcelo Mignoni, pela paciência e disposição. Por todo conhecimento transmitido.

Aos professores Jamile Zeni, Alexander Junges e Rogério Cansian pelas contribuições durante os seminários.

Aos bolsistas Suelen, Bruna, Carolina, Elton e Victor pelo enorme auxílio na parte experimental.

A Aline e a Ilizandra (Sandy) pelas contribuições durante o trabalho.

Aos meus colegas do mestrado pelos bons momentos durante as aulas.

A Universidade Regional Integrada URI-Erechim, pela oportunidade.

As minhas queridas Veri e Bruna, minhas irmãs do coração pelo amor e parceria de sempre.

As amigas Bárbara, Gabrielle, Julia, Karol, Luana, Natália e Raquel, que mesmo distantes nunca deixam de estar presentes.

A Roberta, Keli e a Fernanda, pelas dicas valiosas, e que apesar do pouco tempo de convívio já contribuíram muito para meu crescimento.

Enfim a todos que de uma forma ou outra contribuíram para que este trabalho fosse concluído, minha gratidão.

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

## **ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*) UTILIZANDO A TÉCNICA SOL-GEL**

Tuany Camila Honaiser  
Abril/2017

Orientadores: Dra. Natália Paroul  
Dr. Marcelo Luis Mignoni

O presente trabalho teve como objetivo imobilizar, a enzima lipase NS-40116 de *Thermomyces lanuginosus*, em matriz hidrofóbica obtida pela técnica de sol-gel. O tetraetilortosilicato foi empregado como precursor da sílica. Para a etapa de formação do sol-gel foram avaliados três catalisadores: um ácido (HCl), um básico (NH<sub>4</sub>OH) e outro nucleofílico (HBr). Também foi avaliada a influência do uso do agente de estabilização, o polietilenoglicol (PEG 1500), na imobilização. A eficiência do processo foi avaliada através da medida de atividade de esterificação dos derivados obtidos comparados com a enzima livre. O uso do aditivo PEG 1500, proporcionou um aumento na atividade dos imobilizados e do rendimento, sendo o imobilizado básico com PEG que apresentou maior atividade enzimática e rendimento, 787,37 U/g e 1533,27%, respectivamente. Os derivados submetidos a análise de difração de raio-x (DRX) apresentaram comportamento de material amorfo. O processo de imobilização proporcionou um aumento na estabilidade térmica em relação à enzima livre. O derivado básico com PEG manteve 50% de atividade residual após quatro ciclos. A enzima livre e o imobilizado básico foram empregados na síntese do éster butirato de citronelila e apresentaram conversões de 33,6 e 21,7 %, respectivamente a 40°C/24h, e 38,8 e 31,6% respectivamente a 60°C/24h. O potencial de hidrólise da enzima foi avaliado com a lipase em sua forma livre e imobilizado básico, durante 20 min. a 37°C e apresentaram resultados de 6,80 e 32,33 U/g, respectivamente. O xerogel básico com adição de PEG, foi considerado, o imobilizado mais eficiente, apresentando maior atividade enzimática, maior rendimento, maior número de ciclos e estabilidade térmica.

Palavras-chave: lipase, NS-40116, imobilização, sol-gel.

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

**STUDY OF IMMOBILIZATION OF LIPASE NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*)  
BY THE SOL-GEL TECHNIQUE.**

Tuany Camila Honaiser

April/2017

Advisors: Dra. Natália Paroul  
Dr. Marcelo Luis Mignoni

The present work aimed to immobilize the enzyme lipase NS-40116 from *Thermomyces lanuginosus* in a hydrophobic matrix obtained by sol-gel technique. The Tetraethylorthosilicate was used as the silica precursor. For the sol-gel formation step three catalysts were analyzed: one acid (HCl), one basic (NH<sub>4</sub>OH) and another nucleophilic (HBr). The Polyethylene glycol (PEG 1500) was used as a stabilizing agent (additive), where the influence of the use on immobilization was analyzed. The efficiency of the process was evaluated by measuring the esterification activity of the derivatives obtained compared to the free enzyme. The use of the PEG 1500 additive, provided an increase in the activity of the immobilized and the yield, being the basic immobilized with PEG which presented greater enzymatic activity and yield, 787,37 U / g and 1533,27%, respectively. The derivatives submitted to x-ray diffraction (XRD) had shown amorphous behavior. The immobilization process provided an increase in thermal stability over the free enzyme. The basic PEG derivative maintained 50% residual activity after four replicates. The free enzyme and the basic derivative were used in the synthesis of the citronellil butyrate ester and they had shown conversions of 33.6 and 21.7%, respectively at 40 ° C / 24h, and 38.8 and 31.6% respectively at 60 ° C / 24h. The hydrolysis potential of the enzyme was evaluated with lipase in its free and basic immobilized form during 20 minutes at 37 ° C and they presented results of 6.80 and 32.33 U / g, respectively. The basic immobilized with PEG was considered the most efficient immobilized, presenting higher enzymatic activity, higher yield, higher number of recycles and thermal stability.

Palavras-chave: lipase, NS-40116, immobilization, sol-gel.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                             | <b>13</b> |
| <b>1.1 Objetivos .....</b>                                                                                                                            | <b>14</b> |
| 1.1.1 Objetivo geral.....                                                                                                                             | 14        |
| 1.1.2 Objetivos específicos.....                                                                                                                      | 14        |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                                                                                  | <b>15</b> |
| <b>2.1 Enzimas .....</b>                                                                                                                              | <b>15</b> |
| <b>2.2 Lipases .....</b>                                                                                                                              | <b>16</b> |
| 2.2.1 Lipase NS 40116.....                                                                                                                            | 17        |
| <b>2.3 Imobilização enzimática .....</b>                                                                                                              | <b>18</b> |
| 2.3.1 Métodos de Imobilização Enzimática .....                                                                                                        | 19        |
| 2.3.2 Técnica sol-gel .....                                                                                                                           | 22        |
| 2.3.3 Uso de aditivos .....                                                                                                                           | 24        |
| <b>2.4 Aplicação de lipases.....</b>                                                                                                                  | <b>24</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                     | <b>27</b> |
| <b>3.1 Materiais .....</b>                                                                                                                            | <b>27</b> |
| <b>3.2 Imobilização enzimática pela técnica sol-gel .....</b>                                                                                         | <b>27</b> |
| <b>3.3 Determinação de atividade de esterificação.....</b>                                                                                            | <b>28</b> |
| <b>3.4 Determinação do rendimento da imobilização .....</b>                                                                                           | <b>29</b> |
| <b>3.5 Estabilidade térmica .....</b>                                                                                                                 | <b>29</b> |
| <b>3.6 Estabilidade operacional (reusos).....</b>                                                                                                     | <b>29</b> |
| <b>3.7 Esterificação.....</b>                                                                                                                         | <b>29</b> |
| 3.7.1 Determinação da conversão de éster .....                                                                                                        | 30        |
| <b>3.8 Determinação do potencial de hidrólise .....</b>                                                                                               | <b>30</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                 | <b>32</b> |
| <b>4.1 Caracterização dos imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico obtidos pela técnica de sol-gel.....</b>                               | <b>32</b> |
| <b>4.2 Caracterização dos imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico obtidos pela técnica de sol-gel por difração de raios x (drx).....</b> | <b>33</b> |
| <b>4.3 Determinação da atividade de esterificação e do rendimento da imobilização da enzima ns-40116 .....</b>                                        | <b>34</b> |
| <b>4.4 Avaliação de interferência/competição do aditivo peg com a lipase ns-40116 .....</b>                                                           | <b>35</b> |
| <b>4.5 Estabilidade térmica da enzima ns-40116.....</b>                                                                                               | <b>36</b> |
| <b>4.6 Estabilidade operacional – reuso .....</b>                                                                                                     | <b>37</b> |

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.7 Determinação da conversão de éster .....</b>     | <b>39</b> |
| <b>4.8 Determinação de potencial de hidrólise .....</b> | <b>40</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>                                 | <b>42</b> |
| <b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>         | <b>43</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                 | <b>44</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1-</b> Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas.....                                                          | 20 |
| <b>Tabela 2</b> - Aplicações industriais de lipases .....                                                                                                | 25 |
| <b>Tabela 3</b> - Rendimento da imobilização da enzima lipase NS-40116 em xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500. .... | 35 |
| <b>Tabela 4</b> - Avaliação de atividade enzimática do aditivo PEG 1500. ....                                                                            | 36 |
| <b>Tabela 5</b> - Conversões de butirato de citronelila através da lipase NS-40116 livre e imobilizada. ....                                             | 39 |
| <b>Tabela 6</b> - Atividade de hidrólise da enzima NS-40116 livre e imobilizada em meio básico. ....                                                     | 40 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Tipos básicos de imobilização de enzimas. ....                                                                                         | 19 |
| <b>Figura 2</b> - Desenvolvimento da técnica sol-gel. ....                                                                                               | 31 |
| <b>Figura 3</b> - Difractogramas de raios X dos derivados imobilizados na presença da enzima NS-40116: (a) suporte ácido com PEG, (b) suporte ácido..... | 33 |
| <b>Figura 4</b> - Estabilidade térmica NS-40116. ....                                                                                                    | 36 |
| <b>Figura 5</b> - Estabilidade operacional – reuso da lipase NS-40116.....                                                                               | 38 |

## LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E UNIDADES

%: Porcentagem;

°C: Graus Celsius;

μL: Microlitros;

μm: Micrometros;

μmol: Micromols;

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

AE: atividade de esterificação por grama do imobilizado (U);

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

CE: carga enzimática (g de enzima/g de suporte).

d: Dias;

DRX: Difração de Raio X;

g: grama;

h: Horas;

kDa: KiloDaltons;

kPa: Kilopascal;

M: molar;

ME: massa de enzima (g);

mg: miligrama;

min: minutos;

mL: Mililitros;

PEG: Polietilenoglicol;

pH: Potencial de hidrogênio iônico;

pI: Ponto Isoelétrico;

PS: Peso do suporte imobilizado (g);

R: Rendimento do imobilizado (%);

rpm: Rotação por minuto;

TEOS: Tetraetilortosilicato;

U: Unidade de atividade (μmol);

## 1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que catalisam diversas reações, tais como a hidrólise completa ou parcial de triacilgliceróis e as reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios. Apresentam importância relevante para a indústria, devido a sua versatilidade. Seu uso está associado a produção de aromas, hidrólise de gorduras, modificação de sabor, remoção de lipídios entre outros.

No entanto, o uso de enzimas na sua forma livre torna-se limitado devido à baixa estabilidade, possibilidade de desnaturação frente a diferentes temperaturas ou pHs, elevado custo, e impossibilidade de reutilização tendo em vista que por serem solúveis, findos os processos catalíticos, encontram-se misturadas com o substrato e os produtos, sendo economicamente desfavorável sua recuperação do meio.

A imobilização enzimática que consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, visa diminuir tais limitações. Inúmeros são os métodos para imobilizar enzimas, dentre os mais estudados estão: confinamento, encapsulamento, ligação ao suporte (ligação iônica, adsorção, Van der Waals) e ligação intercruzada (FORDE E Ó'FÁGÁIN, 2008).

Em meio a diversas técnicas de imobilização enzimática destaca-se a de sol-gel, pois preserva a atividade enzimática e minimiza a sua lixiviação. No processo sol-gel a hidrofobicidade reforçada na matriz de óxido de silício se correlaciona com o aumento da atividade da enzima (GUISAN, 2006). Maior estabilidade térmica e atividade enzimática parecem resultar de interações multipontos por meio de ligações de hidrogênio. Ainda é possível adicionar aditivos como o polietilenoglicol (PEG) para melhorar ainda mais a atividade e estabilidade da lipase imobilizada.

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo imobilizar a lipase NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*) através da técnica sol-gel, por esta apresentar um protocolo simples de execução, além de ser realizada em temperaturas brandas, reduzindo os danos a enzima, avaliar as características do imobilizado, além de verificar possíveis aplicações de esterificação e hidrólise.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi a imobilização da lipase NS-40116 através da técnica sol-gel.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito dos catalisadores (ácido, básico e nucleofílico) no processo de imobilização;
- Determinar a atividade de esterificação da lipase NS-40116 na forma livre e imobilizada;
- Avaliar a estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada;
- Avaliar a estabilidade operacional da enzima imobilizada;
- Verificar capacidade de hidrólise e esterificação da lipase NS-40116 na forma livre e imobilizada.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, serão abordados de forma resumida, os fundamentos teóricos necessários para o desenvolvimento dos objetivos delineados. Um breve relato do que são as lipases dando ênfase a imobilização enzimática e ao sistema sol-gel.

### 2.1 Enzimas

Pode-se definir as enzimas como catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e organismos sem se alterarem. Na larga maioria dos casos são proteínas apesar de já existirem exemplos importantes de RNAs catalíticos ou ribozimas com atividade catalítica (WEIL, 2000).

De acordo com Monteiro e Silva (2009) as enzimas possuem algumas vantagens frente aos catalisadores químicos, que justificam seu amplo uso:

- i. São produtos naturais biológicos e biodegradáveis
- ii. Têm alta especificidade nas reações
- iii. Não são consumidas durante o processo
- iv. Aumentam a velocidade das reações por diminuírem a energia de ativação
- v. São estéreo seletivas
- vi. Atuam em pH e temperaturas brandas

Talvez uma das características mais importantes das enzimas seja sua alta especificidade. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

As enzimas são usualmente classificadas e nomeadas de acordo com a reação química que elas catalisam. No entanto, um esquema para a classificação sistemática funcional e nomenclatura de enzimas foi adotado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) devido ao avanço desta ciência com relação ao número crescente de enzimas descobertas. Existem seis grandes classes de reações enzimáticas:

- Oxidoredutases: Reações de oxidação – redução;
- Transferases: Transferência de grupos funcionais;
- Hidrolases: Reações de hidrólise;
- Liasas: Remoção de grupos para formar ligações duplas (sem ser por hidrólise);

- Isomerases: Reações de isomerização;
- Ligases: Reações de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP.

Há milhares de anos, as enzimas vêm sendo utilizadas em processos tradicionais. Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de microrganismos. Embora as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais sejam muito utilizadas, as de origem microbiana são mais utilizadas por várias razões como, por exemplo: produção independente de fatores sazonais, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas e o fato de o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante (SAID E PIETRO, 2004).

## 2.2 Lipases

As lipases são enzimas que catalisam hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Atuam também em reações de esterificação e interesterificação entre outras, e são altamente seletivas, sendo biocatalisadores aplicáveis à produção de diversos produtos (ZANETTE et al., 2014).

Segundo Granda et al. (2008) e Barbosa et al. (2011) as lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Do ponto de vista industrial as lipases microbianas são consideradas de maior importância, porque além de apresentarem procedimentos mais simples de obtenção, a partir do caldo fermentativo, são geralmente mais estáveis e com propriedades mais diversificadas.

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

As lipases destacam-se entre as principais enzimas usadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio, regio e enantiosseletividade (KAPOOR e GUPTA, 2012). Entre os motivos que fazem das lipases as enzimas mais usadas em sínteses orgânicas estão os fatos de não precisarem de coenzimas e de serem suficientemente estáveis em solventes orgânicos e temperaturas relativamente altas (SANTANIELLO et al., 1993).

### 2.2.1 Lipase NS 40116

A enzima microbiana lipase NS-40116 é proveniente do microrganismo *Thermomyces lanuginosus*, apesar de ser uma lipase originária de um microrganismo termófilo, a temperatura ótima para a atividade enzimática situa-se entre 30 e 40 °C, podendo apresentar uma atividade ainda significativa até 60 °C (FERNANDES et al., 2004; NEVES PETERSEN et al., 2001; RIBEIRO et al., 2011).

Silva et al. (2016) produziram ésteres metílicos através de hidroesterificação a partir de gordura abdominal de frango com a lipase NS-40116 livre e relatam que a enzima apresenta-se como um caldo enzimático do microrganismo modificado, ainda em fase de estudo, que será lançada no mercado com um baixo custo quando comparada com as enzimas já existentes, específica para matérias-primas de alto teor de ácidos graxos livres, possui alta atividade em condições brandas de processo, e é capaz de realizar reação de hidroesterificação. Santos (2016), ao produzir ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto com a lipase NS-40116 livre observou que a enzima é capaz de esterificar os ácidos graxos livres presentes na matéria.

Entretanto as aplicações acima podem ser limitadas por alguns fatores, como: instabilidade enzimática, dificuldade de recuperação e reuso da enzima. Para contornar estes problemas, diferentes estratégias têm sido estudadas, como por exemplo, desenvolvimento de materiais e técnicas para imobilização enzimática (FREITAS, 2006).

### 2.3 Imobilização enzimática

É comum observar as vantagens do uso de enzimas com diversas finalidades, além de se verificar as excelentes propriedades como seletividade, atividade e especificidade destas. Entretanto é possível melhorar ainda mais estas aplicações de forma a adequar as enzimas para suas reações, melhorando o custo-benefício, diminuindo tempo de reação, permitindo a sua reutilização.

Enzimas imobilizadas são definidas como biocatalisadores que estão contidos ou localizados em um micro ambiente e que ainda mantém suas propriedades catalíticas, sendo, portanto, a imobilização, um método utilizado para a manutenção da estabilidade das enzimas, tornando-as mais atrativas para a indústria (MORENO-PIRAJAN e GIRALDO, 2011).

Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um derivado imobilizado variam de aplicação para aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura; possibilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência se é usado um reator contínuo (GUISAN, 2006; HANEFELD et al., 2009; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Garcia-Galan et al. (2011) consideram pontos relevantes, que devem ser almejados em um processo de imobilização para um biocatalisador industrial adequado: (i) a resistência mecânica; (ii) a simplicidade do protocolo de imobilização; (iii) a possibilidade de acoplar a imobilização com a purificação da enzima; (iv) o impacto da imobilização na atividade da enzima; (v) estabilização da enzima através da prevenção de interações intermoleculares, pelo enrijecimento estrutural da enzima, ou ainda pela prevenção da dissociação de subunidades da enzima; (vi) modulação da seletividade ou especificidade da enzima, (vii) redução dos problemas de inibição.

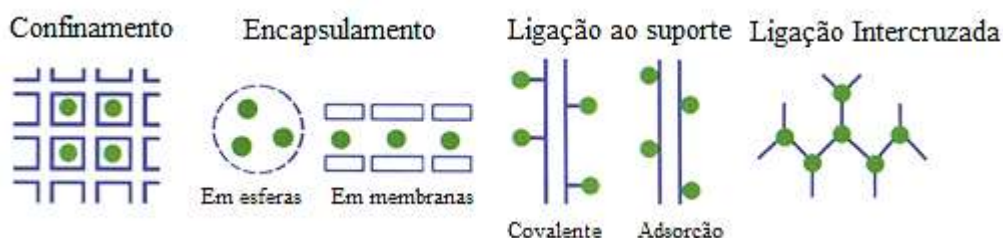
A lipase *Candida antarctica* B (Cal B) imobilizada por confinamento em poliuretano, apresentou um rendimento de 535% frente a enzima livre além de 30 ciclos (NYARI et al., 2016). Badgujar e Bhanage (2016) imobilizaram várias lipases de diferentes origens em suporte de hidroxipropil-metil-celulose (HMC), e observaram que a lipase de *Pseudomonas* apresentou 2,1-2,5 vezes maior atividade biocatalítica e reciclabilidade de até cinco vezes em comparação

com a enzima livre. Ao imobilizar uma lipase proveniente do pâncreas suíno por ligação covalente em um suporte de nanocomposto de ferro, Heidariadeh et al. (2017) verificaram que não houve diminuição da atividade enzimática. Já Patel, Deshpande e Madamwar (2017) desenvolveram um sistema de dupla imobilização onde a lipase de *Candida rugosa* foi ligada a partículas de óxido de zinco em seguida foram aprisionadas em micelas reversas de (2-etil-hexil) sulfosuccinato de sódio e posteriormente foram ainda aprisionadas em microemulsão de organogéis preparadas a partir de álcool polivinílico, esta dupla imobilização apresentou maior estabilidade, 90% conversão de éster valerato de pentilo e ésteres de valerato de etilo em n-hexano (8h/40°C) além de 10 reciclos com baixa perda de atividade.

### 2.3.1 Métodos de Imobilização Enzimática

De acordo com Forde e Ó'Fágáin (2008 apud DAMASO et al., 2013), pode-se classificar as técnicas de imobilização enzimática, em quatro tipos básicos (Figura 1): confinamento, encapsulamento, ligação ao suporte e ligação intercruzada.

**Figura 1** - Tipos básicos de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptado de Damaso et al. (2013).

Observando a Figura 1 é possível verificar as seguintes possibilidades de imobilização:

- **Confinamento:** este método está relacionado com a polimerização de materiais orgânicos ao redor da proteína, confinando a enzima em uma matriz física. Apesar de manter a conformação da enzima, pode dificultar a difusão do substrato pelos poros da matriz do suporte.
- **Encapsulamento:** consiste em imobilizar as enzimas no interior de esferas não rígidas, formadas por polímeros geleiformes e semipermeáveis, ou também em membranas semipermeáveis, de maneira que a enzima fique aprisionada em uma dada região da solução.

- Ligação ao suporte: pressupõem a ligação da enzima ao suporte (sílica, aço, alumina, poliacrilamida, entre outros) através de ligações covalentes, iônicas, adsorção, van der Waals, entre outras.
- Ligação intercruzada: é uma forma de imobilização sem suporte. Se baseia na produção de agregados tridimensionais de enzimas insolúveis em água através de reagentes bi ou multifuncionais, que se ligam covalentemente as enzimas.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (GANDHI et al., 1995).

O processo de imobilização implica na interação entre a enzima e o suporte, que fornecem diferentes propriedades cinéticas, mecânicas, químicas e bioquímicas, assim, as características da superfície de ambos são importantes (TISCHER e KASCHE, 1999; HANEFELD et al., 2009). Para projetar um biocatalisador imobilizado a principal tarefa é selecionar o suporte adequado às condições de reação (pH, temperatura e natureza do meio) e à enzima em si (natureza, fonte e pureza) (CAO, 2005). Desta forma, um suporte criteriosamente escolhido pode melhorar significativamente o desempenho operacional do sistema imobilizado.

As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para imobilização são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo, dentre outras (MENDES et al., 2011).

Segundo Canilha et al. (2006) os suportes podem ser classificados em 5 tipos:

1. Microporosos ou não-porosos (nylon, sílica, vidro);
2. Microencapsulados (nitrocelulose, triacetato de celulose);
3. Polímeros com moderado grau de ligações cruzadas (poliacrilamida);
4. Polímeros com baixo grau de ligações cruzadas (sephadex, dietilaminoetil-celulose);
5. Macroporosos e mesoporosos (sílica, alumina).

Os suportes macro e mesoporos como sílica e alumina vem despertando muito interesse nos últimos anos. A sílica ( $\text{SiO}_2$ ) é um dos materiais multifuncionais descritos na literatura com elevado potencial de aplicação para imobilização, principalmente devido à possibilidade de modificação da superfície deste suporte, atendendo assim a classificação da IUPAC,

estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica (CARVALHO et al., 2015; BENVENUTTI et al., 2009).

Na Tabela 1 é possível observar vários tipos de suporte utilizados para imobilização de enzimas, bem como sua classificação e aplicação:

**Tabela 1-** Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas.

| Natureza  | Classificação do suporte | Suporte                                         | Lipase                          | Referência                   |
|-----------|--------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Natural   | Orgânico                 | Bagaço de cana de açúcar                        | <i>Termomyces lanuginosus</i>   | Mendes et al, 2013.          |
|           |                          | Quitosana                                       | <i>Talaromyces thermophilus</i> | Romdhane et al, 2011.        |
|           |                          | Fibra de coco                                   | <i>Candida antarctica B</i>     | Brígida et al, 2007.         |
|           | Inorgânico               | Nanofibra                                       | <i>Candida rugosa</i>           | Zhu e Sun, 2012.             |
|           |                          | Argila                                          | Pâncreas suíno                  | Scherer et al, 2012.         |
|           |                          | Sílica                                          | <i>Rhizopus oryzae</i>          | Kharrat et al, 2011.         |
| Sintético | Orgânico                 | Poliuretano                                     | <i>Rhizopus oryzae</i>          | Grosso et al, 2013.          |
|           |                          | *PHBV                                           | <i>Bacillus sp. ITP-001</i>     | Cabrera-Padilla et al, 2013. |
|           |                          | Polipropileno                                   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>  | Salis et al, 2008.           |
|           |                          | Eupergit C                                      | <i>Rhizopus oryzae</i>          | Nunes et al, 2012.           |
|           | Inorgânicos e orgânicos  | **POS-PVA                                       | <i>Rhizopus oryzae</i>          | Paula et al, 2011.           |
|           | Inorgânicos              | Sílica                                          | <i>Bacillus sp. ITP-001</i>     | Carvalho et al, 2013.        |
|           |                          | Nanopartícula de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | <i>Pseudomonas cepacia</i>      | Andrade et al, 2010.         |
|           |                          | Alumina                                         | <i>Bacillus sp.</i>             | Kumar et al, 2013.           |

\*PHBV: Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato); \*\*POS-PVA: tetra-etilortossilicato-álcool polivinílico. Fonte: Carvalho et al., 2015.

Dentre os métodos de preparação de sílica a técnica sol-gel merece um destaque especial que será demonstrado a seguir.

### 2.3.2 Técnica sol-gel

O método de sol-gel é atualmente o meio mais amplamente utilizado. Neste caso, os poros do suporte tem que ser de tamanho suficiente para garantir a difusão dos substratos sem impedimentos, assegurando simultaneamente que a enzima permaneça retida (HANEFELD et al., 2009). O encapsulamento sol-gel atraiu uma considerável atenção em áreas como biotecnologia, medicina, farmacêutica, catálise, nutrição e ecologia (KATO et al., 2011). O encapsulamento através de sol-gel provou ser uma técnica versátil para a imobilização de uma grande variedade de biomoléculas (KANDIMALLA et al., 2006).

A produção de matrizes sol-gel é iniciada pela hidrólise parcial dos precursores (silicatos de alquilo ou alcoxisilanos), resultando em um oligômero que pode ser transesterificado com glicerol. O oligômero presente é totalmente hidrolisado, formando-se uma dispersão coloidal (sol), sendo adicionada uma solução contendo o biocatalisador, dando início ao processo de policondensação. Deste resulta a formação de uma fase distinta (o hidrogel ou xerogel) contendo o biocatalisador. A matriz é então envelhecida, resultando, no final do processo, nano ou micromatrizes (CABRAL et al., 2003).

A hidrólise deste processo ocorre de forma relativamente lenta, o que torna necessário o uso de catalisadores, a natureza do catalisador, ácido ou básico, influencia diretamente na cinética de reação, assim como, na estrutura final do gel (ENCARNACIÓN, 2014).

Se a hidrólise for catalisada por base, a reação deve se processar através de uma substituição nucleofílica, e a velocidade de hidrólise será maior que a velocidade de condensação, levando à formação de cadeias mais ramificadas no início do processo. Se a hidrólise for catalisada por ácido, vai ocorrer uma reação eletrofílica, e a velocidade da condensação será maior que a da hidrólise, levando à formação de cadeias mais longas e menos ramificadas no início do processo. (JOSÉ e PRADO, 2005).

No processo sol-gel a hidrofobicidade reforçada na matriz de óxido de silício se correlaciona com o aumento da atividade da enzima. Maior estabilidade térmica e atividade enzimática parecem resultar de interações multipontos por meio de ligações de hidrogênio, bem como interações iônicas e hidrofóbicas (Van der Waals). As interações hidrofóbicas podem resultar em um tipo de ativação interfacial, a lipase pode ter sua forma conformacional presa na matriz com a "tampa - aberta", ou seja, na sua forma ativa (GUISAN, 2006). Conferindo assim, uma estabilidade mecânica e química superiores aos polímeros convencionais, permitindo uma retenção eficiente do biocatalisador, além de uma estabilidade operacional e de armazenamento elevadas (CABRAL et al., 2003).

Além da possibilidade de obter os componentes orgânico e inorgânico altamente dispersos, o método sol-gel de síntese apresenta outras características interessantes, tais como: i) as reações de gelificação são processadas a brandas temperaturas, o que permite inserir à matriz sólida biomoléculas como enzimas, proteínas e anticorpos, de difícil incorporação por outros métodos que utilizem temperaturas mais elevadas; ii) possibilidade de obter materiais sob diferentes configurações como fibras, corpos cerâmicos, monolitos, filmes, membranas e pós (KEELING-TUCKER et al., 2001; AVNIR et al., 2006; CORADIN et al., 2006; KICKELBICK, 2008).

A imobilização de enzimas no interior de matrizes produzidas pelo processo de sol-gel é uma técnica muito vantajosa, pois preserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação, ao contrário do que ocorre, na maioria das vezes, com filmes finos ou membranas empregadas como suporte (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

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

Além disso este processo apresenta alguns inconvenientes, pois durante a etapa de formação do gel, a enzima pode perder seu potencial catalítico e estabilidade. Desta forma, é comum a utilização de aditivos a fim de minimizar estes efeitos negativos (SOUZA, 2012).

Zubiolo et al. (2014) imobilizaram lipase de *Aspergillus* através da técnica sol-gel, utilizando como tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor de sílica, o método demonstrou ser eficiente, a enzima livre demonstrou perda de massa de 95% à 350°C, já o biocatalisador encapsulado manteve 60% de sua massa em temperatura superior à 1000°C avaliado por análise termogravimétrica. Ficanha et al. (2015) encontraram resultados satisfatórios, como 07 ciclos e 60-70% de conversão de éster (40°C/40 min.) ao imobilizar a lipase Cal B através da técnica sol-gel, utilizando TEOS como precursor de sílica. Já Yuce-Dursun et al. (2016) imobilizaram lipase de *Candida rugosa* por sol-gel utilizando epóxi-sílica como precursor de sílica, e ao final de 30 ciclos repetidos, 56% e 59% das atividades iniciais permaneceram para os ensaios hidrolíticos e sintéticos, respectivamente. A enzima nativa perdeu completamente sua atividade

em 20 dias, enquanto que a enzima imobilizada retida para atividades hidrolíticas e sintéticas foi de aproximadamente 82% e 72%, respectivamente, sob o mesmo tempo de armazenamento.

### 2.3.3 Uso de aditivos

Um significativo melhoramento na atividade e estabilidade de enzimas imobilizadas pode ser observado quando o procedimento de imobilização é realizado em presença de aditivos (SOARES et al., 2006; HARA et al., 2010). O estudo destes aditivos está associado com sua co-imobilização em processo de encapsulamento, sendo alguns de seus efeitos atribuídos a: (i) proteção da inativação da enzima durante a etapa de imobilização; (ii) retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e (iii) efeitos dispersantes das moléculas da enzima e facilitadores de transporte de massa quando aditivos são usados como matrizes de imobilização, podendo ele estar presente ou ausente no meio de dispersão (SOARES et al., 2003).

Nem todos os aditivos são eficientes como estabilizantes. A seleção do aditivo adequado é função do tipo de enzima e do método de imobilização. No caso específico das lipases, que exigem uma interface para sua total atividade catalítica, o uso de aditivos macromoleculares tem mostrado efeitos estabilizantes significativos, por meio do revestimento da interface impedindo, desta forma, uma mudança de sua estrutura proteica (SOARES et al., 2003). Dentre os principais aditivos utilizados na imobilização de enzimas, destacam-se a caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, álcool polivinílico, Aliquat 336, líquidos iônicos e polietilenoglicol (PEG) (CABRERA-PADILLA et al., 2013).

O uso de PEG como aditivo concede melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, o que permite um melhor contato entre a interface água/óleo, e favorece uma condição necessária para a expressão da atividade hidrolítica da lipase imobilizada (SOARES et al., 2003).

Soares et al. (2003) avaliaram o efeito da adição de polietilenoglicol e albumina na imobilização de *Candida rugosa*, e verificaram que o rendimento mais elevado (56,9%) foi obtido quando foi utilizado PEG-1500 como agente estabilizante. Ficanha et al. (2015) relataram melhores resultados das amostras de *Candida antarctica* (CAL B) imobilizadas em sol-gel com aditivo PEG-1500, quando comparadas as amostras sem aditivo.

## 2.4 Aplicação de lipases

As lipases dominam cerca de 5% do mercado mundial de enzimas. Entretanto nota-se uma inclinação ao crescimento deste mercado, devido ao crescente número de aplicações ainda em desenvolvimento (HASAN et al., 2006).

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3) são muito utilizadas, em virtude da grande gama de reações que podem catalisar, como a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA et al., 2001), além de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios.

São inúmeras as indústrias que fazem uso de lipases em sua produção, conforme a Tabela 2.

**Tabela 2** - Aplicações industriais de lipases

| INDÚSTRIA               | AÇÃO                                                                           | PRODUTO OU APLICAÇÃO                                                         |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Detergentes             | Hidrólise de gorduras                                                          | Remoção de óleos                                                             |
| Derivados de laticínios | Hidrólise da gordura do leite, maturação de queijos, modificações de manteigas | Desenvolvimento de agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga        |
| Panificação             | Melhorador de sabores                                                          | Prolongar a vida de prateleira                                               |
| Bebidas                 | Aromas                                                                         | Bebidas                                                                      |
| Carnes e peixes         | Desenvolvimento de sabores                                                     | Remoção de gordura de produtos de carnes e peixes                            |
| Gorduras e óleos        | Transesterificação, hidrólise                                                  | Manteiga de cacau, margarinas, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídios |
| Cosméticos              | Síntese                                                                        | Emulsificantes, umidificantes                                                |
| Papel                   | Hidrólise                                                                      | Melhoria da qualidade de papel                                               |
| Couro                   | Hidrólise                                                                      | Produtos de couro                                                            |

**Fonte:** Adaptado de Sharma et al., (2001).

Uma área importante de aplicação das lipases é no desenvolvimento de biossensores, onde as lipases podem ser imobilizadas em eletrodos de pH ou de oxigênio (neste caso utiliza-

se a enzimas glicerol quinase e glicerol 3-fosfato), que em conjunto funcionam como biossensor de lipídios, que estão sendo desenvolvidos para determinação de triglicerídeos em amostras de sangue (PUNDIR et al., 2010).

Objetiva-se com este trabalho testar a capacidade de hidrólise de lipídios e esterificação de aromas da lipase NS-40116 livre e imobilizada.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e metodologias empregados, bem como os procedimentos laboratoriais executados.

#### 3.1 Materiais

A lipase utilizada foi uma formulação líquida de enzima livre termoestável desenvolvida recentemente pela empresa Novozymes®, denominada NS-40116, produzida e modificada a partir do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*. O polietilenoglicol (PEG 1500, Merck) foi usado como agente de estabilização (aditivo). Para a imobilização pela técnica de sol-gel foi utilizado como precursor da sílica o Tetraetilortosilicato (TEOS) (Aldrich), hidróxido amônia (mínimo 28 %) (Quimex), ácido clorídrico (mínimo 36 %) (Vetec). Para determinação da atividade de esterificação foram utilizados: álcool etílico (mínimo 99%) (Merck), acetona (Merck), ácido oleico (Synth), hidróxido de sódio (Synth) e água destilada. Para esterificação foi utilizado Ácido Butírico (Vetec) e Citronelol 95% (Sigma-Aldrich). Para hidrólise utilizou-se azeite de oliva (Galo), goma arábica (Synth) e tampão fosfato 100mM pH 7,0.

#### 3.2 Imobilização enzimática pela técnica sol-gel

A metodologia empregada foi adaptada da descrita por Soares et al. (2006). Inicialmente, 5 mL de TEOS foram dissolvidos em 5 mL de etanol absoluto. Após a dissolução, adicionou-se 1,61 mL de água destilada e três gotas do catalisador, em uma proporção molar de água e TEOS de 4:1. Como catalisadores da reação de condensação utilizou-se ácido clorídrico (ácido), hidróxido de amônio (básico) e ácido bromídrico (nucleofílico).

Posteriormente, os sistemas reacionais foram submetidos a uma etapa de agitação, em agitador orbital (shaker), a 40 °C, 180 rpm, por um período de 90 minutos. Passado este período, fez-se a adição de 1 mL da solução enzimática (160 mg.mL<sup>-1</sup>).

Na amostra para o teste do uso do aditivo foi adicionado 1 mL de uma solução do aditivo PEG 1500 na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>. Nas reações conduzidas em meio ácido e nucleofílico foi adicionado 1,75 mL da solução hidrolisante (0,25 mL de hidróxido de amônio dissolvidos em 1,5 mL de etanol).

Em seguida, os sistemas reacionais foram mantidos em condições estáticas por 24 horas para completar a condensação química. Após este tempo, o suporte foi acondicionado em dessecador a vácuo por mais 24 horas para completa secagem e evaporação da água. Posteriormente os imobilizados foram peneirados, de modo a padronizar a granulometria.

### 3.3 Determinação de atividade de esterificação

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

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

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto, calculada pela Equação 1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) * M * 1000 * V_f}{t * m * V_c} \quad (1)$$

Onde:

AE : Atividade de esterificação (U/g);

V<sub>a</sub> : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL);

V<sub>b</sub> : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL);

M : Molaridade da solução de NaOH;

V<sub>f</sub> : Volume total de meio reacional (mL);

t : Tempo (minutos);

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

V<sub>c</sub> : Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

### 3.4 Determinação do rendimento da imobilização

O rendimento do derivado imobilizado foi calculado a partir da Equação 2:

$$R(\%) = \frac{AT}{AA} * 100 \quad (2)$$

Onde:

AT: Atividade de esterificação total do derivado;

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

### 3.5 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica do derivado imobilizado e da enzima livre foram realizadas pela reação de esterificação em temperaturas de 40, 60 e 70°C. Seguindo a mesma metodologia especificada no item 3.3, apenas alterando a temperatura da reação. Os resultados de atividade foram comparados com os da atividade inicial.

### 3.6 Estabilidade operacional (reusos)

Devido à ausência de uma metodologia definida na literatura, a estabilidade operacional do reuso foi realizada de forma direta. Onde após os 40 minutos de reação, o meio reacional foi removido do sistema, fez-se nova adição dos substratos (ácido oleico e etanol), levou-se a amostra para nova reação. A cada troca do meio reacional, mediu-se a atividade enzimática. As reações foram repetidas até o derivado chegar a uma atividade residual maior ou igual a 50 % da atividade inicial.

### 3.7 Esterificação

A fim de avaliar a eficiência da lipase comercial NS-40116 na forma livre e imobilizada para a produção de butirato de citrônella (aroma de ameixa), preparou-se uma mistura

reacional de citrônolol com ácido butírico, nas condições fixas de 10 (% m/m substratos) de enzima imobilizada, 2 (% m/m substratos) de enzima livre que correspondeu a uma concentração igual a 0,2g de enzima em ambos os casos, razão molar 1:3 (ácido/álcool) e temperatura de 40 °C e 60 °C por 24 horas.

Optou-se utilizar a razão molar 1:3 (ácido/álcool), haja visto que a razão molar álcool/ácido é um parâmetro importante em reação de esterificação uma vez que a reação é reversível. Segundo Chiaradia et al. (2012) e Azudin et al. (2013) um excesso de álcool pode afetar positivamente o processo de conversão. Alta concentração de álcool (nucleófilo/receptor de acilo) geralmente leva aos níveis mais elevados de conversão devido a disponibilidade de excesso de nucleófilo para transferência do substrato.

### 3.7.1 Determinação da conversão de éster

A quantificação de produção de butirato de citrônolila foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30 m x 250 µm d.i.), 0,25 µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180 °C (3 °C/min), 180-230 °C (20 °C/min), 230 °C (20 min), temperatura do injetor 250 °C, detector a 275 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H<sub>2</sub> (56 kPa), volume injetado 0,4 µL de amostra diluída em n-hexano (1:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante.

## 3.8 Determinação do potencial de hidrólise

A atividade enzimática foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela adição de 18 g de azeite de oliva, 9 g de goma arábica a 5% (p/v) e 180 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) em homogeneizador portátil. Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 18 mL de substrato e 0,1 g de enzima livre que correspondeu a uma concentração igual a 0,5g de enzima imobilizada. Os frascos foram incubados a 37 °C por 20 minutos a 160 rpm em shaker. Após o período de incubação, a reação foi finalizada pela adição de 20 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). 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). Paralelamente, foram feitos ensaios de branco utilizando apenas a emulsão e a solução de acetona-etanol, sem adição de lipase. A definição da atividade hidrolítica da lipase (livre e imobilizada) foi feita de acordo com a Equação 3.

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

Onde:

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

Va = volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

Vb = volume do NaOH gasto na titulação do branco (mL);

M = concentração da solução de NaOH (M);

m = massa de enzima (gramas);

t = tempo de reação (minutos).

### **3.9 Caracterização dos imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico obtidos pela técnica de sol-gel por difração de raios x (DRX)**

Os suportes foram caracterizados por difração de raios X (DRX) (Rigaku, Miniflex II, Ka- 1,58 Cu).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o trabalho de imobilização e aplicação da lipase NS-40116.

### 4.1 Caracterização dos imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico obtidos pela técnica de sol-gel

Na Figura 2 é possível observar o desenvolvimento da técnica sol-gel tanto para os derivados ácido e nucleofílico – A1 a A4, quanto para o derivado básico – B1 a B4.

**Figura 2** - Desenvolvimento da técnica sol-gel.



Sendo: 1A – Fase inicial dissolução de TEOS, etanol, água, catalisador (ácido ou nucleofílico); A2 – Após 90 min. Em agitador orbital a 40°C; A3 – Adição da enzima e de solução hidrolisante; A4 – Produto final pós secagem. B1 – Fase inicial dissolução de TEOS, etanol, água, catalisador (básico); B2 – Após 90 min. Em agitador orbital a 40°C; B3 – Adição da enzima; B4 – Produto final pós secagem.

**Fonte:** a autora (2017).

De acordo com Cabral et al. (2003) a produção de matrizes sol-gel é iniciada pela hidrólise parcial dos precursores (silicatos de alquila ou alcoxisilanos), resultando em um oligômero que pode ser transesterificado com glicerol. O oligômero presente é totalmente hidrolisado, formando -se uma dispersão coloidal (sol), sendo adicionada uma solução contendo o biocatalisador, dando início ao processo de policondensação, fase esta que pode ser verificada

na Figura 2, sendo A1 e A2 para o catalisador ácido e nucleofílico, e B1 e B2 para o catalisador básico.

O termo sol é utilizado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estáveis em um fluido, enquanto o termo gel pode ser definido como um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios (ALFAYA E KUBOTA, 2002).

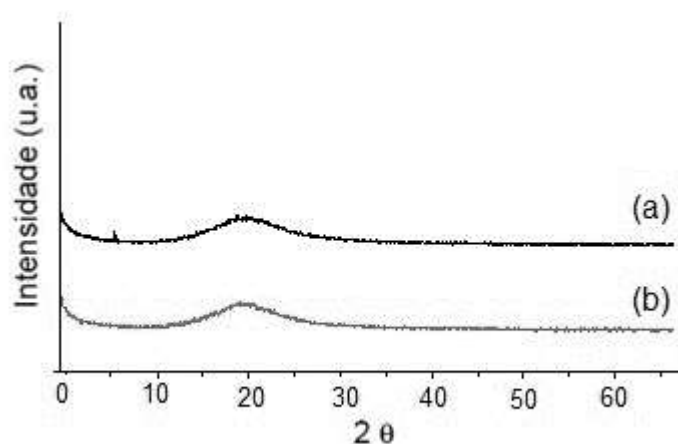
Nas etapas A3 e B3 é possível verificar a formação da fase gel, nesta etapa a solução ou sol transforma-se em gel pelo estabelecimento de ligações químicas entre as partículas ou entre as espécies moleculares, levando à formação de uma rede sólida tridimensional (HIRATSUKA et al., 1995).

As imagens A4 e B4 demonstram o produto final chamado xerogel quando seco em temperatura ambiente, resultante do processo de poli condensação da fase gel contendo a enzima encapsulada (CABRAL et al., 2003).

#### **4.2 Caracterização dos imobilizados em xerogel ácido, básico e nucleofílico obtidos pela técnica de sol-gel por difração de raios x (DRX)**

A Figura 3 exibe os difratogramas de raios X para os derivados ácido e ácido com PEG, na presença da enzima lipase NS-40116 obtidos pela técnica de sol-gel. Para melhor apresentação do difratograma, optou-se por apresentar apenas o resultado de duas amostras, entretanto todas as amostras foram submetidas a análise, e ambas apresentaram características muito semelhantes.

**Figura 3** - Difratomogramas de raios X dos derivados imobilizados na presença da enzima NS-40116: (a) suporte ácido com PEG, (b) suporte ácido.



Fonte: a autora (2017).

Conforme observado na Figura 3, os suportes obtidos na presença da lipase NS-40116 não apresentaram picos característicos de materiais cristalinos, e sim, halos na região compreendida entre 15 – 30° ( $2\theta$ ), os quais são característicos de materiais sem ordenação cristalina, ou seja, de materiais amorfos.

De acordo com Bernardes et al. (2011) de maneira geral, materiais obtidos pelo método sol-gel, são amorfos. As reações de hidrólise e condensação do monômero de silício em presença de um catalisador ácido ou básico atuam como agente de ligação cruzada com a formação da estrutura amorfa  $\text{SiO}_2$ , na qual o reticulado tridimensional é formado ao redor da enzima (HENCH et al., 1990).

#### **4.3 Determinação da atividade de esterificação e do rendimento da imobilização da enzima ns-40116**

A Tabela 3 exhibe a massa obtida de imobilizado, a atividade do imobilizado por grama, a atividade de esterificação total do imobilizado e os rendimentos obtidos da imobilização de xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500. Para imobilização foi adicionado 1 grama de enzima livre para cada imobilizado, esta apresentava 274,22 U de atividade de esterificação.

**Tabela 3** - Rendimento da imobilização da enzima lipase NS-40116 em xerogel ácido, básico e nucleofílico com e sem o uso do aditivo PEG 1500.

| Xerogel          | Enzima Imobilizada |          |         |         |
|------------------|--------------------|----------|---------|---------|
|                  | PS (g)             | AE (U/g) | AT (U)  | R (%)   |
| Ácido            | 4,35               | 371,82   | 1617,42 | 589,85  |
| Ácido PEG        | 5,31               | 365,97   | 1943,30 | 708,91  |
| Básico           | 4,54               | 440,51   | 1999,91 | 729,38  |
| Básico PEG       | 5,34               | 787,31   | 4204,23 | 1533,27 |
| Nucleofílico     | 3,90               | 234,45   | 914,35  | 333,30  |
| Nucleofílico PEG | 5,25               | 268,82   | 1411,30 | 514,62  |

PS: peso seco do imobilizado; AE: atividade de esterificação por grama do imobilizado; AT: atividade total do imobilizado; R: rendimento do derivado;

Através da Tabela 3, é possível observar que o imobilizado que apresentou a maior atividade enzimática, bem como maior rendimento 1533,27% foi o xerogel básico com aditivo PEG. Bordinhão et al. (2015) imobilizaram lipase de *Thermomyces lanuginosus* por ligação covalente uni e multipontual em quitosana e obtiveram rendimentos que variaram de 16,6 até 94,1%. Ficanha et al. (2015) ao imobilizar lipase Cal-B pelo método sol-gel, verificaram maior rendimento do imobilizado nucleofílico com PEG (92,32%).

Nota-se também através da Tabela 3, que todos os imobilizados com aditivo PEG apresentaram maior rendimento se comparados ao xerogel sem adição de aditivo, fato já relatado pela literatura (FICANHA et al., 2015; SOUZA, 2012). A presença de polietilenoglicol afeta o nível de umidade, modificando a hidrofobicidade da lipase com o meio, além de alterar a morfologia dos poros, facilitando assim a transferência de massa interna e proporcionando uma melhor acessibilidade do substrato (YI et al, 2005).

#### 4.4 Avaliação de interferência/competição do aditivo peg com a lipase ns-40116

A Tabela 4 demonstra que sem a presença de enzima, os derivados mesmo com presença do aditivo PEG 1500 não apresentaram atividade de esterificação, o que justifica que o aumento da atividade enzimática no item 4.1 dos derivados com adição de PEG, ocorre pelas melhorias das características do xerogel, e não porque o aditivo apresente alguma atividade enzimática.

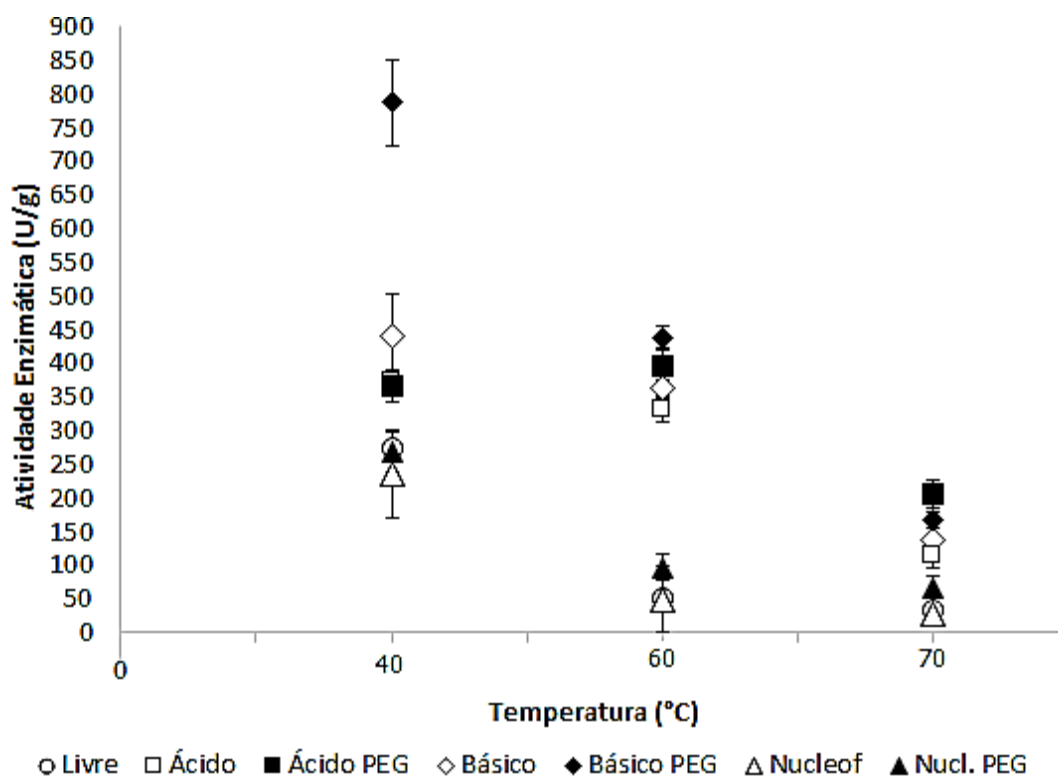
**Tabela 4** - Avaliação de atividade enzimática do aditivo PEG 1500.

| Xerogel      | Enzima Adicionada |        |        |
|--------------|-------------------|--------|--------|
|              | ME (g)            | PS (g) | AE (U) |
| ÁCIDO PEG    | 0                 | 4,29   | 0      |
| BÁSICO PEG   | 0                 | 4,24   | 0      |
| NUCLEOF. PEG | 0                 | 4,27   | 0      |

ME: massa de enzima; PS: peso seco do derivado; AE: atividade de esterificação por grama do imobilizado.

#### 4.5 Estabilidade térmica da enzima NS-40116

Para que uma enzima tenha potencial para aplicação industrial um requisito importante é a estabilidade térmica, já que muitos processos utilizam temperatura na faixa de 40 a 50°C (CARVALHO et al., 2013). A Figura 4 apresenta a atividade enzimática da enzima livre e imobilizada em meio ácido, básico e nucleofílico com e sem adição de PEG 1500, após a reação de esterificação em shaker a 40, 60 e 70°C.

**Figura 4** - Estabilidade térmica NS-40116.

Fonte: a autora (2017).

Através da Figura 4, percebe-se que todas as amostras apresentaram decréscimo de atividade conforme o aumento da temperatura da reação. Observa-se ainda que os imobilizados ácido e básico com e sem PEG apresentaram maior estabilidade térmica que a enzima livre, já o imobilizado nucleofílico com e sem PEG demonstraram resultados semelhantes ao da enzima livre.

Ainda é possível verificar que a amostra de imobilizado básico que continha o aditivo PEG apresentou maior estabilidade térmica comparado as demais amostras.

Os imobilizados ácido e básico com e sem PEG demonstraram os melhores resultados, mesmo a 60°C exibiram aproximadamente 50% da atividade inicial, e apresentaram atividade a 70°C. A enzima livre e os imobilizados nucleofílicos com e sem PEG apresentaram atividade bem reduzida a 70°C.

Não há um método padrão definido para avaliar a estabilidade térmica o que dificulta a comparação dos resultados.

Ao avaliar a estabilidade térmica da lipase *Bacillus* sp. ITP-001 imobilizada em sol-gel, Carvalho et al. (2013) descreveram que a lipase mostrou estabilidade térmica a 37 °C e manteve atividade residual na faixa de 50%.

Ficanha et al. (2015) relataram que a enzima Cal-B imobilizada em sol-gel, ao ficar disposta 60 min. na temperatura de 80 °C, os únicos xerogéis que apresentaram atividade residual foram os básicos, com e sem PEG, com atividade residual de 38 e 20%, respectivamente.

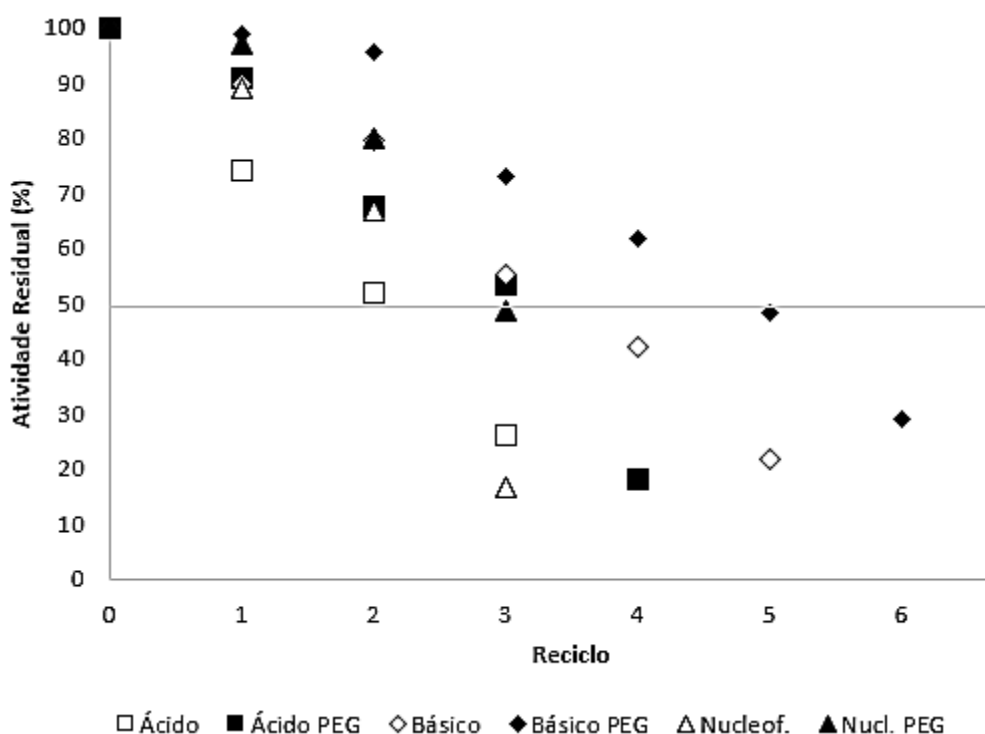
Ao imobilizar a enzima  $\beta$ -galactosidase em materiais híbridos de sílica e quitosana, Ricardi (2016) relata que nas temperaturas de 60 e 70°C houve perda total de atividade, em 40°C a enzima imobilizada no suporte Sílica e Quitosana 10%, apresentou menor decaimento, e após 24 horas apresentou 20% de atividade residual.

#### **4.6 Estabilidade operacional – reuso**

A reutilização de enzimas em mais de um ciclo de reação é um dos principais objetivos da imobilização, este fato é importante para as lipases devido ao seu preço, visto que, o custo da enzima é um dos principais problemas quando se refere 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 et al., 2015).

A estabilidade operacional de reuso da lipase NS-40116 imobilizada em sol-gel foi avaliada em reuso contínuo e os resultados são apresentados na Figura 5:

**Figura 5** - Estabilidade operacional – reuso da lipase NS-40116.



Fonte: a autora (2017).

De acordo com a Figura 5 a amostra que apresentou melhor resultado foi o básico com PEG que manteve mais que 50% de atividade residual após 4 reciclos. Cabe ressaltar que o decréscimo da atividade catalítica com consequência da redução da atividade residual pode estar relacionada à desnaturação da enzima ou também por lixiviação no decorrer dos reciclos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Braga et al. (2014) que relataram que a enzima  $\beta$ -galactosidase imobilizada em Eupergit®C mostrou que o sistema enzima/suporte manteve até 50% da atividade inicial após 5 ciclos de utilização. Antunes et al. (2015) observaram que a lipase *Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano de densidade D30 e D18, apresentou um número de reciclos igual a 5, com atividade residual em torno de 50% no 5 reciclo.

Ficanha (2014) imobilizou *Candida antarctica* B através da técnica sol-gel e obteve o melhor resultado com o derivado básico com PEG que apresentou 5 reusos. Já a lipase de

*Bacillus* sp. imobilizada pela técnica de sol-gel usando Aliquat 336 como aditivo, manteve até 50% da atividade inicial após 3 ciclos de reuso de acordo com estudo de Souza et al. (2012).

#### 4.7 Determinação da conversão de éster

Os processos biotecnológicos oferecem diversas vantagens e se mostram como uma alternativa competitiva aos métodos químicos, devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e a seletividade dos catalisadores naturais (CHANG et al., 2007).

Para testar o potencial catalítico da lipase NS-40116, foi realizada a reação de esterificação usando como substratos o ácido butírico e citrônolol, para produção de butirato de citrônolila que possui como principais características odor forte de rosa, frutal e gosto doce de ameixa. Pode ser empregado em bebidas não alcoólicas (3,8 ppm), sorvetes (11 ppm), doces (13 ppm), gelatinas e pudins (3,1 a 4,2 ppm) e gomas de mascar (2,3 ppm). Além disso, está presente nos aromas naturais de abacaxi e de ameixa (FENAROLI, 1971; MELO, 2004).

Para a síntese de butirato de citrônolila, foi utilizada a lipase NS-40116 na forma livre e o imobilizado básico com PEG, que apresentou os melhores resultados de atividade enzimática. A razão molar ácido-álcool foi 1:3 e o tempo de reação foi fixado em 24 horas.

O excesso de um dos reagentes é necessário para aumentar a velocidade de conversão da reação na obtenção do produto (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; STAMENKOVIĆ et al., 2011; ZHAO et al., 2014). Os resultados das conversões são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Conversões de butirato de citrônolila através da lipase NS-40116 livre e imobilizada.

| NS-40116    | % Conversão |          |
|-------------|-------------|----------|
|             | 40°C/24h    | 60°C/24h |
| Livre       | 33,6        | 38,8     |
| Imobilizado | 21,7        | 31,6     |

A lipase NS-40116 em sua forma livre não apresentou diferença de conversão nas diferentes temperaturas (33,6%/40°C; 38,8%/60°C), já o imobilizado básico apresentou uma diferença de 10% de conversão com o aumento da temperatura. A temperatura apresenta um dos principais papéis em sistema reacional, em função de aumento das colisões entre substratos e biocatalisador (SHINDE et al., 2015).

Não se pode afirmar que esta é a conversão máxima, haja visto que não foi realizado teste com mais de 24 h de reação.

De acordo com Dalla-Vecchia et al. (2004) a imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. De acordo com a Tabela 5, neste caso a imobilização reduziu a atividade enzimática.

Quanto o excesso de ácido, segundo Castro et al., (1997) com exceção do ácido acético, o tamanho da cadeia influencia de maneira pouco significativa no rendimento de esterificação. Ácidos de cadeias alifáticas contendo quatro ou mais carbonos, são considerados excelentes doadores do grupo acila. Que é o caso do ácido butírico, aqui utilizado, que apresenta quatro carbonos.

Mendes et al. (2013) imobilizaram lipase de *Thermomyces lanuginosus* em quitosana-alginato por diferentes protocolos, e obtiveram de 42,9 a 57,4% de conversão de Butirato de butila, após 24h de reação a 37°C.

#### 4.8 Determinação de potencial de hidrólise

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras, ou lipólise, é bem conhecida e vem sendo estudada para produzir ácidos graxos e modificar as gorduras por esterificação, transesterificação e interesterificação (PADILHA E AUGUSTO-RUIZ, 2007).

A fim de avaliar o potencial de hidrólise da lipase NS-40116, a enzima foi aplicada em sua forma livre e imobilizada obtida em meio básico, para reação com azeite de oliva e goma arábica. Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Atividade de hidrólise da enzima NS-40116 livre e imobilizada em meio básico.

| NS-40116           | Atividade de hidrólise<br>(U/g) |
|--------------------|---------------------------------|
| Livre              | 6,80 ±1,57                      |
| Imobilizado Básico | 32,33±1,08                      |

Através da Tabela 6 observa-se que a lipase NS-40116 apresenta potencial de hidrólise de lipídios, tanto na sua forma livre como imobilizada. Entretanto o imobilizado básico apresentou atividade hidrolítica cinco vezes maior que a enzima livre.

Santos (2016) obteve o valor de 3,29 U/mL de atividade hidrolítica para a lipase NS-40116 livre, ao avaliar a liberação do p-nitrofenol por espectrofotômetro.

Bezerra et al. (2016) imobilizaram lipase de *Thermomyces lanuginosus* em nanopartículas superparamagnéticas (NPM) de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e avaliaram a atividade hidrolítica a partir da hidrólise do  $\rho$ -Nitrofenilbutirato ( $\rho$ NPB), por espectrofotômetro, e observaram que a lipase imobilizada em NPM com polietilenimina ramificada teve atividade hidrolítica 7 vezes maior quando ligada ao suporte por troca iônica (195,5 U/g) do que quando imobilizada por ligações covalentes (27,8 U/g). Já no caso das NPM com  $\gamma$ -aminopropiltietoxissilano, ambos os derivados apresentaram valores de atividade próximos a 140 U/g de suporte.

## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado um estudo referente a imobilização da lipase NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*), utilizando a sílica como precursor da técnica sol-gel, e diferentes catalisadores de reação, um ácido (HCl), um básico (NH<sub>4</sub>OH) e outro nucleofílico (HBr). Além de se avaliar a influência do polietilenoglicol (PEG 1500) como aditivo da imobilização.

Tendo em vista os resultados obtidos pode-se concluir que:

Após análises de difração de raios X (DRX), observou-se que os imobilizados apresentam características de material amorfo.

O uso do aditivo PEG 1500, proporcionou um aumento na atividade do derivado e consequentemente do rendimento. Verificou-se também que o mesmo, sem enzima, não apresenta atividade de esterificação.

O processo de imobilização proporcionou um aumento na estabilidade térmica operacional em relação à enzima livre.

Os resultados demonstram a possibilidade de reutilizar os derivados básico, ácido e ácido com PEG por até três vezes, e o derivado básico com PEG por até quatro vezes, considerando 50% de atividade residual.

O xerogel básico com adição de PEG, foi considerado, o imobilizado mais eficiente, apresentando maior atividade enzimática, maior rendimento, maior número de ciclos e estabilidade térmica.

Sendo assim observa-se que é possível imobilizar a lipase NS-40116 através da técnica sol-gel, que o imobilizado básico com PEG apresentou os melhores resultados em geral e verificou-se ainda que a lipase NS-40116 apresenta capacidade de esterificação e hidrólise, tanto em sua forma livre quanto imobilizada.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a produção de butirato de citrônella usando a enzima imobilizada NS-40116 em meio básico e avaliar os efeitos das variáveis: razão molar, concentração de enzima, temperatura e tempo reacional;
- Verificar o efeito de diferentes condições de hidrólise: tempo reacional, temperatura, concentração de enzima;
- Testar o uso de outros aditivos na imobilização da NS-40116 como polivinilálcool (PVA) e líquidos iônicos;
- Avaliar a imobilização da enzima NS-40116 pela técnica de sol-gel com o uso de outros precursores de sílica como o trimetilortossilicato (TMOS) para a preparação de xerogéis e aerogéis;
- Avaliar a estabilidade frente a diferentes pH;
- Avaliar a estabilidade operacional (reusos) dos derivados nas diferentes reações na qual serão aplicados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFAYA, A.; KUBOTA, L. T. A. Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 935-841, 2002.
- ALONSO-MORALES, N. et al. Reversible immobilization of glutaryl acylase on sepabeads coated with polyethyleneimine. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 533-536, 2008.
- ANDRADE, L. H. et al. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 55-62, 2010.
- ANTUNES, A. et al. Estudo da estabilidade operacional em reciclo contínuo direto da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em espuma flexível de PU de 30 e 18. In: **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química de Iniciação Científica, Campinas – SP, 2015**.
- AVNIR, D. et al. Recent bio-applications of sol-gel materials. **Journal of Material Chemistry**, n. 16, p. 1013 – 1030, 2006.
- AZUDIN, N.Y.; MAD DON, M.; SHUKOR, S.R.A. Production and kinetics of isoamyl acetate from acetic anhydride using *Candida antarctica* Lipase B in a solvent-free system. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1057-1062, 2013.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of  $\beta$ -amino ester compounds. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1420-1433, 2016.
- BARBOSA, J.M.P. et al. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography**, v. 879, p. 3853-3858, 2011.
- BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, n. 7, 2009.
- BERNARDES, A. A. et al. SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> materials for diuron photocatalytic degradation. **Química Nova**, v. 34, n. 8, 2011.
- BEZERRA, R. M. et al. **Imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em nanopartículas superparamagnéticas: efeito da modificação da superfície do suporte**. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XXI COBEQ, Fortaleza - CE, 2016.
- BORDINHÃO, C. et al. **Estudo das condições de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* para produção de biodiesel**. In: XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química para Iniciação Científica – Anais do XI COBEQIC, Campinas - SP, 2015.
- BRAGA, A.R.C. et al. A new approach to evaluate immobilization of  $\beta$ -galactosidase on eupergit<sup>®</sup> c: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 796-803, 2014.

- BRIGIDA, A.I.S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 67, p.137-140, 2007.
- CABRAL, J.M.S.; AIRES - BARROS, M.R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Ed. Lidel- Edições Técnicas, Lisboa, 2003.
- CABRERA-PADILLA, R.Y. et al. Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, *Bacillus* sp. ITP-001. **Bioprocess and Biosystem Engineering**. v. 36, p. 1385–1394, 2013.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biocatalisadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.36, n.6, p.48-57, 2006.
- 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, p. 399-409, 2015.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 17, n. 3, 1997.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2005.
- CHANG, S. W. et al. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v.42. p. 1362–1366, 2007.
- CHIARADIA, V. et al. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 742-751, 2012.
- CORADIN, T. et al. Sol-gel biopolymer/ silica nano-composites in biotechnology. **Current Nanoscience**, n. 2, p 219-230, 2006.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DAMASO, M. C. T.; FARINAS, C. S.; SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de enzimas aplicadas a produção de etanol e biodiesel**. In: MACHADO, C. M. M., Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos. Editora Técnica, Embrapa Agroenergia, Brasília, p. 101-125, 2013.
- ENCARNACIÓN, R. A. B. **Preparação via processo sol-gel de catalisadores a base de níquel na reação de deslocamento gás-água: Efeito do ácido fosfotungstico e organosilanos**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2014.

FENAROLI, G. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. Handbook Editors. The Chemical Rubber Co. Cleveland. 1971. 803 p.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginose* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 43-49, 2004.

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.

FICANHA, A. M. M. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (CALB) pela técnica de sol-gel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, Erechim, 2014.

FICANHA, A. M. M. et al. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v. 38, 2015.

FREITAS, L. de. **Seleção de rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2006.

FORDE, J.; Ó FÁGÁIN, C. Immobilized enzymes as industrial biocatalysts. In: FLYNE, W. G. (Ed.) **Biotechnology and Bioengineering**. New York: Nova Science Publishers, p. 9-36, 2008.

GANDHI, N. N. et al. **Enzyme Microbial Technology**, v. 17, n. 373, 1995.

GARCIA-GALAN, C. et al. **Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance**. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Humana Press: Totowa, 2006.

GRANDA, K. M. et al. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n. 1, 2008.

GROSSO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PIRES-CABRAL, P. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 475 - 480, 2013.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 379-386, 2002.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HARA, P. et al. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, n.12, p.1-6, 2010.

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

HEIDARIZADEH, M. et al. Dithiocarbamate to modify magnetic graphene oxide nanocomposite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GO): A new strategy for covalent enzyme (lipase) immobilization to fabrication a new nanobiocatalyst for enzymatic hydrolysis of PNPD. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 696-702, 2017.

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

HERNÁNDEZ - RODRÍGUEZ, B. et al. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n. 3–4, p. 136-142, 2008.

HIRATSUKA, R. S., SANTILLI, C. V., PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, p. 171-180, 1995.

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

KANDIMALLA, V.B.; TRIPATHI, V. S.; JU, H.X. Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v.36, p. 73–106, 2006.

KANWAR, S. S. et al. Synthesis of geranyl butyrate with the poly(acrylic acid-co-hydroxy propyl methacrylate-cl-ethylene glycol dimethacrylate) hydrogel immobilized lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 110, p. 2681, 2008.

KAPOOR, M; GUPTA, M. N. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 503-508, 2012.

KHARRAT, N. et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, n. 46, p.1083–1089, 2011.

KATO, K. et al. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme - assisted sol–gel reactions in ionic liquids. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 119, n. 1386, p. 140-143, 2011.

KEELING-TUCKER, T.; BRENNAN, J. D.; Fluorescent Probes as Reporters on the Local Structure and Dynamics in Sol-Gel-Derived Nanocomposite Materials. **Chemistry of Materials**, v. 13, p. 3331 – 3350, 2001.

KICKELBICK, G. The search of a homogeneously dispersed material—the art of handling the organic polymer/metal oxide interface. **Journal Sol-Gel Science Technology**, v. 46, n. 3, p. 281–290, 2008.

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

KUMAR, D. et al. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51 – 61, 2013.

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.

MELO, L. L. M. M. **Síntese enzimática dos ésteres de aroma butirato e valerato de citrônella por lipase de *Rhizopus* sp.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, n. 5, São Paulo, 2011.

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

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v.3, n.5, p.09-23, 2009.

MORENO-PIRAJAN, J.C.; GIRALDO, L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, p.55–62, 2011.

NEVES PETERSEN, M. T.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p.115-147, 2001.

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.

NUNES, P. A. et al. Optimized Production of MLM Triacylglycerols Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 1287 – 1295, 2012.

PADILHA, M. E. da S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Enzymatic hydrolysis of the fish oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 285-290, 2007.

PATEL, V.; DESHPANDEB, M.; MADAMWARA, D. Increasing esterification efficiency by double immobilization of lipase-ZnO bioconjugate into sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT)- reverse micelles and microemulsion based organogels. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 182-188, 2017.

PAULA, A. V. et al. Interesterification of milkfat with soybean oil catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilised on SiO<sub>2</sub>-PVA on packed bed reactor. **International Journal of Food Science + Technology**, v. 46, p. 2124 – 2130, 2011.

PUNDIR, C. S. et al. An amperometric cholesterol biosensor based on epoxy resin membrane bound cholesterol oxidase. **Indian Journal of Medical Research**, v. 136, 2010.

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

RIBEIRO, B. D. et al. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 16, 2011.

RICARDI, N. C. **Desenvolvimento de suportes porosos de sílica e suportes híbridos de sílica/quitosana para aplicação em catálise enzimática**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.

ROMDHANE, I. B. B. et al. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, p. 230-239, 2011.

SAID, S.; PIETRO, R. C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1 ed. Ribeiro Preto: Legis Summa Ltda, 2004.

SALIS, A. et al. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 19 -26, 2008.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P. Lipaze-catalized Transesterification in Organic Solvents: Application of Enantiomerically Pure Compounds. **Enzyme Microbial Technology**, n. 15, p. 367-382, 1993.

SANTOS, J. M. B. dos. **Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto (*acrocomia aculeata*) empregando enzima livre**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

SCHERER, R. P. et al. Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, p. 290 – 294, 2012.

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

SHINDE, S. D.; GANAPATI D.; YADAV, G.D. Insight into microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of geranyl cinnamate: optimization and kinetic modeling. **Applied Biochemistry Biotechnol**, v. 175, p. 2035–2049, 2015.

SILVA, J. R. P. da. et al. Hidroesterificação de Gordura Abdominal de Frango Catalisada pela Lipase NS-40116. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. 2016.  
Disponível em: <<https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4464-enzitec2016.pdf>> Acesso em: 13 out. 2016.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, 1999.

SOARES, C. M. F. et al. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v. 26, n. 6, São Paulo, 2003.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 69-76, 2006.

SOUZA, R. L. de. **Emprego de aditivos na imobilização sol-gel de lipases**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos. Universidade Tiradentes. 2012.

SOUZA, R. L. et al. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p.152-159, 2012.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3141-3155, 2011.

TISCHER, W.; KASCHE, V. **Immobilized enzymes: crystals or carriers Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 326-335, 1999.

YI, H. et al. Biofabrication with chitosan. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2881–2894, 2005.

YUCE-DURSUN, B. et al. Preparation and characterization of sol–gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 18-25, 2016.

WEIL, J. **Bioquímica Geral**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

ZANETTE, A. F.; AWADALLAK, J.; FILHO, L.C. Imobilização de lipases regioseletivas em matrizes sol-gel e reação parcial de hidrólise. **Journal of Exact Sciences**, v.3, n.1, p.05-08, 2014.

ZHAO, T. et al. Novel strategy for lipase - catalyzed synthesis of biodiesel using blended alcohol as an acyl acceptor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 17-22, 2014.

ZHU, J.; SUN, G. Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities. **Reactive and Functional Polymers**, n. 72, p. 839-845, 2012.

ZUBIOLO, C. et al. Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 37, p. 1781-1788, 2014.