

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

CÁTIA SANTIN ZANCHETT BATTISTON

**IMOBILIZAÇÃO *in situ* DE LIPASE *Candida antarctica* B (CALB) EM MATERIAL
MESOPOROSO DO TIPO MCM-48 UTILIZANDO SÓLIDOS IÔNICOS COMO
DIRECIONADORES DE ESTRUTURA**

ERECHIM - RS

2017

CÁTIA SANTIN ZANCHETT BATTISTON

**IMOBILIZAÇÃO *in situ* DE LIPASE *Candida antarctica* B (CALB) EM MATERIAL
MESOPOROSO DO TIPO MCM-48 UTILIZANDO SÓLIDOS IÔNICOS COMO
DIRECIONADORES DE ESTRUTURA**

Tese apresentada como quesito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Orientadores: Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni
Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

ERECHIM - RS

2017

CÁTIA SANTIN ZANCHETT BATTISTON

**IMOBILIZAÇÃO *in situ* DE LIPASE *Candida antarctica* B (CALB) EM MATERIAL
MESOPOROSO DO TIPO MCM-48 UTILIZANDO SÓLIDOS IÔNICOS COMO
DIRECIONADORES DE ESTRUTURA**

Tese apresentada como quesito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Câmpus de Erechim.

Erechim, 30 de maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dra. Andressa Sausen de Freitas / IFRS Erechim

Prof^a. Dra. Simone Golunski / UFFS Erechim

Prof^a. Dra. Ilizandra Aparecida Fernandes / URI Erechim

Prof^a. Dra. Natália Paroul / URI Erechim

Ao meu esposo, Marcelo e aos meus pais,
Cláudio e Edir.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, prof. Marcelo e prof. Rogério, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo exemplo de profissionais, pela amizade e por contribuírem diretamente para a minha formação desde a graduação.

Ao meu esposo, Marcelo, por todo amor, confiança, incentivo e paciência durante esses anos de estudo.

Aos meus pais, Cláudio e Edir, que tiveram papel importante para execução desta etapa, e que proporcionaram a base para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs, Cláudia e Carina, pelo incentivo e auxílio durante a execução do trabalho.

À amiga e colega Aline, obrigada pela amizade, apoio e ajuda incondicional. Você realmente foi fundamental para a realização deste trabalho!!

Aos bolsistas de iniciação científica, Katharine, Bernardo, Mateus, Elen e Greice pelo incansável auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos amigos e colegas do IFRS, Cris, Mona, Josi, Vini, Airton, Guilherme e Andressa, que acompanharam e dividiram comigo vários momentos durante esses anos.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado durante esta etapa. MUITO OBRIGADA!!!

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”*

(Martin Luther King)

RESUMO

A lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) é uma enzima capaz de atuar em diversas reações químicas, dentre elas, hidrólise, esterificação e transesterificação, porém seu uso na forma livre é dificultado pela sua estabilidade e recuperação. Uma alternativa para superar essas limitações é o processo de imobilização em suportes que mantenham as atividades catalíticas da enzima. Materiais mesoporosos do tipo MCM-48 são uma opção como suportes de imobilização enzimática por serem inertes e com pouca ou nenhuma interferência no comportamento da enzima, além disso, apresentam várias propriedades importantes principalmente para aplicações catalíticas e adsorptivas, tais como, poros com formas bem definidas, alta área superficial, boa estabilidade térmica, hidrotérmica e mecânica. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi imobilizar a lipase CALB em material mesoporoso do tipo MCM-48, utilizando os seguintes sólidos iônicos como direcionadores de estrutura: [C₁₆MI]Cl (cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio) e [C₁₄MI]Cl (cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio). Os materiais foram caracterizados através das análises de ressonância magnética nuclear (RMN), difração de raios X (DRX) e adsorção e dessorção de N₂ (BET). Para todas as análises os resultados obtidos foram característicos dos materiais sintetizados. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² completo foi proposto, para ambos os suportes, para verificar a influência das variáveis massa de enzima e concentração de sólido iônico na imobilização enzimática, a fim de otimizar o processo e obter a máxima atividade de esterificação. Para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl as variáveis otimizadas foram de 0,20 g de enzima e 1,90 % de sólido iônico com atividade de esterificação de 469,61 U/g e rendimento de 822 %. Para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl as variáveis otimizadas foram de 0,31 g de enzima e 3,35 % de sólido iônico com atividade de esterificação de 392,92 U/g e 688 % de rendimento. A enzima imobilizada em ambos os suportes apresentou melhor estabilidade de armazenamento, térmica e operacional em comparação com a enzima em sua forma livre. Resultados promissores foram obtidos com a utilização dos biocatalisadores na produção de ésteres a partir do geraniol. Os resultados obtidos mostraram que a imobilização pela técnica *in situ* apresentou-se eficaz, possibilitando o aprisionamento da enzima no interior da rede cristalina do material e o material MCM-48 mostrou-se eficiente e promissor para imobilização da CALB, principalmente pelo custo-benefício do suporte, tornando-se potencial para aplicações industriais.

Palavras-chave: Lipase. Imobilização. MCM-48. Sólidos iônicos.

ABSTRACT

Candida Antarctica lipase B (CALB) is an enzyme able to catalyze several chemical reactions, for example, hydrolysis, esterification and transesterification; however, when it is used as a free enzyme some problems related to stability and recovery can appear. One alternative to overcome this limitation is the immobilization process on supports that can keep the enzyme catalytic activity. Mesoporous materials as MCM-48 are an option to be used as supports of enzymatic immobilization because they are inert and have few or sometimes none interference in the enzymatic behavior, moreover, they exhibit some important features mainly for catalytic and adsorption application, for instance, their pores have a well-defined shape, high surface area, good thermal, hydrothermal and mechanical stability. In this context, the main purpose of this study was the immobilization of the lipase CALB on MCM-48 mesoporous material, using the ionic solids $[C_{16}MI]Cl$ (1-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride) and $[C_{14}MI]Cl$ (1-tetradecyl-3-methylimidazolium chloride) as structure director. The materials were characterized using the nuclear magnetic resonance (NMR), X-ray diffraction (XRD) and adsorption and desorption of N_2 (BET). For all the analysis, the obtained result were characteristic of the synthesized material. In order to optimize the process and to obtain the maximum esterification activity, central composite rotatable design (CCRD) 2^2 full was proposed for both supports, to verify the influence of some variables like mass of the enzyme and ionic solid concentration during the enzyme immobilization. The optimum variables for enzyme/MCM-48 $[C_{16}MI]Cl$ composite was 0.20 g of enzyme and 1.90 % of ionic solid resulting in esterification activity of 469.61 U/g and yield of 822 %. And the optimum variables for enzyme/ MCM-48 $[C_{14}MI]Cl$ composite was 0.31 g of enzyme and 3.35 % of ionic solid resulting in esterification activity of 392.92 U/g and yield of 688 %. The immobilized enzyme on MCM-48 $[C_{16}MI]Cl$ and MCM-48 $[C_{14}MI]Cl$ supports showed better storage, thermal and operational stability than free enzyme. Studies using the biocatalysts produced were performed to obtain esters from geraniol and some promising results were obtained, which showed that immobilization by *in situ* technique was effective, making possible to confine the enzyme inside the crystal lattice and the material MCM-48 revealed to be promising and efficient to immobilize CALB, mainly, due to the cost benefit of the support, becoming a potential for industry application.

Keywords: Lipase. Immobilization. MCM-48. Ionic solids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de publicações contendo o termo “ <i>ionic liquid</i> ”, no título, resumo e palavras-chave, em função do tempo	22
Figura 2 - Unidades primárias de construção	28
Figura 3 - Unidades secundárias de construção.....	28
Figura 4 - Unidades poliédricas de construção.....	29
Figura 5 - Estrutura MCM-48.....	31
Figura 6 - Mecanismo de formação de MCM-41: a) iniciado por cristais líquidos, b) iniciado por sílica (TEOS).....	32
Figura 7 - Modelo proposto para formação de material mesoporoso utilizando LI como direcionadores de estrutura.....	33
Figura 8 - Reações catalisadas pela lipase.....	36
Figura 9 - Esquema geral da reação de esterificação.....	37
Figura 10 - Sítio ativo da <i>Candida antarctica</i> B (CALB).....	39
Figura 11 - Principais métodos de imobilização de enzimas	40
Figura 12 - Fatores que afetam o desempenho de enzimas imobilizadas.....	42
Figura 13 - Fluxograma dos experimentos realizados.....	46
Figura 14 - Reações de síntese dos sólidos iônicos, (a) cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio; (b) cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio.....	47
Figura 15 - Síntese do acetato de geranila e butirato de geranila	54
Figura 16 - Análise de RMN ¹ H do [C ₁₆ MI]Cl	56
Figura 17 - Análise de RMN ¹ H do [C ₁₄ MI]Cl	57
Figura 18 - Difractogramas de raios X dos materiais MCM-48.....	58
Figura 19 - Análise textural de adsorção/dessorção de N ₂	60
Figura 20 - Testes preliminares da atividade de esterificação para a otimização do processo.....	62
Figura 21 - Testes preliminares da atividade de esterificação do derivado imobilizado enzima/MCM-48[C ₁₆ MI]Cl em relação à massa de enzima	63
Figura 22 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da imobilização da CALB em MCM-48[C ₁₆ MI]Cl	66
Figura 23 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da imobilização da CALB em MCM-48[C ₁₄ MI]Cl	70
Figura 24 - Estabilidade ao armazenamento da enzima livre e dos derivados imobilizados ...	72

Figura 25 - Estabilidade térmica da enzima livre e dos derivados imobilizados	73
Figura 26 - Estabilidade operacional dos derivados imobilizados	75
Figura 27 - Curva de contorno para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C ₁₄ MI]Cl.....	79
Figura 28 - Curva de contorno para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C ₁₆ MI]Cl.....	79
Figura 29 - Curva de contorno para a conversão do butirato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C ₁₄ MI]Cl.....	83
Figura 30 - Curva de contorno para a conversão do butirato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C ₁₆ MI]Cl.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais cátions e ânions utilizados na síntese de LI.....	23
Tabela 2 - Características dos sólidos iônicos utilizados	47
Tabela 3 - Variáveis independentes e níveis de variação (valores reais e codificados) para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C ₁₆ MI]Cl.....	52
Tabela 4 - Variáveis independentes e níveis de variação (valores reais e codificados) para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C ₁₄ MI]Cl.....	52
Tabela 5 - Variáveis independentes e níveis de variação (valores reais e codificados) para síntese do acetato e butirato de geranila	55
Tabela 6 - Características dos suportes com e sem a presença da enzima	60
Tabela 7 - Matriz de experimentos do DCCR 2 ² e os resultados da atividade enzimática obtidos na imobilização da CALB em MCM-48[C ₁₆ MI]Cl.....	64
Tabela 8 - Resultados do teste da condição ótima predita pelo modelo para imobilização em MCM-48[C ₁₆ MI]Cl	66
Tabela 9 - Matriz de experimentos do DCCR 2 ² e os resultados da atividade enzimática obtidos na imobilização da CALB em MCM-48[C ₁₄ MI]Cl – Teste preliminar.....	68
Tabela 10 - Matriz de experimentos do DCCR 2 ² e os resultados da atividade enzimática obtidos na imobilização CALB em MCM-48[C ₁₄ MI]Cl.....	69
Tabela 11 - Resultados do teste da condição ótima predita pelo modelo.....	71
Tabela 12 - Matriz do DCC 2 ³ (valores e codificados) com as respostas para a conversão do acetato de geranila	76
Tabela 13 - Matriz do DCC 2 ³ (valores e codificados) com as respostas da conversão do butirato de geranila	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Histórico do desenvolvimento dos líquidos iônicos.....	21
Quadro 2 - Aplicações dos líquidos iônicos	24

LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E UNIDADES

%: Porcentagem	kDa: Kilodalton
[C ₁₆ MI]Cl: Cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio	LCT: <i>Liquid Cristal Templating</i>
[C ₁₄ MI]Cl: Cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio	LI: Líquido iônico
°C: Graus Celsius	LIs: Líquidos iônicos
µL: Microlitro	M: Molar
µmol: Micromol	mg: Miligrama
Å: Ångstrm	min: Minutos
AE: Atividade de esterificação	mL: Mililitros
CALB: Lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B	mmol: Milimol
CMC: Concentração micelar crítica	NaOH: Hidróxido de sódio
CDCl ₃ : Clorofórmio deuterado	NH ₄ OH: Hidróxido de amônio
DCCR: Delineamento composto central rotacional	nm: Nanmetro
DCC: Delineamento composto central	OH ⁻ : Hidroxila
DRX: Difratoograma de raios X	pH: Potencial de hidrogênio
EL: Enzima livre	pI: Ponto isoelétrico
EI: Enzima imobilizada	RMN: Ressonância magnética nuclear
g: Grama	RMN ¹ H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
h: Hora	R ² : Coeficiente de determinação
IUPAC: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	rpm: Rotações por minuto
IZA: <i>International Zeolite Association</i>	SI: Sólido iônico
K: Kelvin	TEOS: Tetraetilortosilicato
	TMOS: Tetrametilortosilicato
	TMAOH: Hidróxido de tetrametilamnio
	U: Unidade de atividade

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE QUADROS.....	12
LISTA DE ABREVIÇÕES, SÍMBOLOS E UNIDADES	13
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Líquidos Iônicos (LIs)	20
3.1.1 Aspectos históricos	20
3.1.2 Estrutura e propriedades	22
3.1.3 Aplicações dos LIs	24
3.1.4 Líquidos iônicos contendo o cátion imidazólio.....	24
3.2 Materiais zeolíticos e mesoporosos.....	25
3.2.1 Histórico	25
3.2.2 Formação e ocorrência de zeólitas naturais.....	27
3.2.3 Estrutura e classificação	27
3.2.4 Aplicações industriais.....	30
3.2.5 Materiais mesoporosos	31
3.2.6 Síntese dos materiais mesoporosos da família M41S.....	32
3.3 Enzimas	34
3.4 Lipases	35
3.4.1 Utilização de lipases para produção de ésteres.....	37
3.4.2 Lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CALB).....	38
3.5 Imobilização enzimática.....	39
3.5.1 Imobilização enzimática em suportes zeolíticos e mesoporosos.....	43
3.6 Considerações Finais	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Materiais utilizados	45
4.2 Métodos experimentais	45
4.2.1 Síntese dos sólidos iônicos	46

4.2.2 Síntese do material mesoporoso MCM-48 e imobilização <i>in situ</i>	47
4.2.3 Análise e caracterização dos materiais obtidos	48
4.2.4 Determinação da atividade de esterificação	49
4.2.5 Determinação do rendimento da imobilização	50
4.2.6 Estudos preliminares para imobilização enzimática.....	51
4.2.7 Delineamento experimental.....	51
4.2.8 Confirmação das condições experimentais ótimas descritas pelo modelo.....	52
4.2.9 Testes de estabilidade	52
4.2.10 Aplicação da enzima imobilizada na produção de ésteres a partir do geraniol.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Caracterização dos sólidos iônicos	56
5.2 Caracterização dos suportes	58
5.2.1 Difração de Raios X	58
5.2.2 Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	59
5.3 Estudos preliminares para otimização do processo de imobilização	61
5.4 Derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl.....	63
5.4.1 Testes preliminares – Efeito da quantidade de enzima.....	63
5.4.2 Delineamento experimental.....	64
5.4.3 Confirmação das condições experimentais ótimas descritas pelo modelo.....	66
5.5 Derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl.....	67
5.5.1 Testes preliminares – Efeito da quantidade de enzima e concentração de sólido iônico	67
5.5.2 Delineamento experimental.....	68
5.5.3 Confirmação das condições experimentais ótimas descritas pelo modelo.....	70
5.6 Estabilidade ao armazenamento	71
5.7 Estabilidade térmica.....	73
5.8 Estabilidade operacional.....	74
5.9 Aplicação da CALB imobilizada em reações de produção de ésteres	76
5.9.1 Produção enzimática de ésteres a partir do geraniol.....	76
6 CONCLUSÕES.....	85
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE A - Análise de variância e coeficiente de regressão para a atividade de esterificação da imobilização em MCM-48[C₁₆MI]Cl.....	101

APÊNDICE B - Análise de variância e coeficiente de regressão para a atividade de esterificação da imobilização em MCM-48[C₁₄MI]Cl.....	102
APÊNDICE C - Análise de variância para a conversão do acetato de geranila.....	103
APÊNDICE D - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de t e p para a conversão do acetato de geranila.....	104
APÊNDICE E - Análise de variância para a conversão do butirato de geranila	105
APÊNDICE F - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t para a conversão do butirato de geranila.....	106
APÊNDICE G - Produções	107

1 INTRODUÇÃO

As enzimas apresentam importantes propriedades funcionais, tais como: atividade, seletividade e especificidade, que as tornam capazes de catalisar processos químicos sob condições ambientais e experimentais amenas, temperatura ambiente e pH próximo da neutralidade, despertando assim um grande interesse na aplicação industrial. Em comparação com os catalisadores químicos convencionais, as enzimas possuem muitas vantagens, entre elas, menor consumo energético, evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes, e, conseqüentemente, não formam subprodutos, muitas vezes prejudiciais ao ambiente.

Dentre a ampla variedade de enzimas, destacam-se as lipases, devido às diversas reações que catalisam, como: esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização. As lipases produzidas por *Candida antarctica* do tipo B (CALB), são bem estabelecidas para fins de biocatálise, devido sua alta atividade, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica, atuação em ampla faixa de pH e elevada especificidade, sendo utilizadas na indústria alimentícia, de detergente, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e oleoquímica.

O uso de enzimas em sua forma livre, apesar de muitas vantagens, torna-se limitado devido ao elevado custo, baixa estabilidade operacional e de armazenamento. Nesse sentido, a imobilização enzimática apresenta-se como uma alternativa para diminuir tais limitações, possibilitando uma maior estabilidade à enzima, facilidade operacional, separação dos produtos do meio reacional, possibilidade de reutilização, além de melhorar a eficiência catalítica.

A escolha do suporte é essencial para o êxito do processo de imobilização, além de influenciar nas etapas de separação, recuperação e reutilização do catalisador. Nesse contexto, o uso de materiais mesoporosos para a imobilização confere ao biocatalisador alguns requisitos essenciais e necessários a um suporte, como estabilidade mecânica e química e facilidade de recuperação. Além disso, esses materiais possuem estruturas que conferem propriedades de grande importância, como: alto grau de hidratação, baixa densidade, grandes canais uniformes nos cristais desidratados, estabilidade da estrutura cristalina, propriedades de troca catiônica, condutividade elétrica, adsorção de gases e vapores e propriedades catalíticas.

Aliado ao exposto, os líquidos iônicos (LIs) também têm atraído grande atenção devido suas características e propriedades, possibilitando a utilização baseada nos princípios

da Química Verde, visando à aplicação de processos químicos ambientalmente mais limpos. Suas aplicações são numerosas e encontradas em diversas áreas, destacando-se na síntese de materiais zeolíticos, onde seu emprego como direcionador de estrutura possibilita que a mesma ocorra em condições amenas de temperatura e pressão e como aditivos no processo de imobilização enzimática.

Diante desse contexto, a realização do trabalho propõe avaliar a imobilização *in situ* da lipase *Candida antarctica* B em materiais mesoporosos do tipo MCM-48 utilizando sólidos iônicos como direcionadores de estrutura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o processo de imobilização *in situ* da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CALB) em material mesoporoso do tipo MCM-48 com a utilização de sólidos iônicos como direcionadores de estrutura.

2.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar imobilizados mesoporosos do tipo MCM-48 contendo a lipase CALB incorporada a sua estrutura;
- b) Caracterizar os materiais mesoporos obtidos;
- c) Avaliar a imobilização da CALB (relação enzima/sólido iônico) visando à maximização da atividade enzimática, empregando o método de planejamento de experimentos;
- d) Avaliar a estabilidade de armazenamento, térmica e operacional dos derivados imobilizados;
- e) Avaliar o efeito dos sólidos iônicos e suas concentrações na estabilidade enzimática e sobre a atividade catalítica da enzima;
- f) Avaliar o efeito dos diferentes suportes empregados na estabilidade enzimática e sobre a atividade catalítica da enzima;
- g) Investigar e comparar a atividade enzimática em meio homogêneo (enzima livre) e em meio heterogeneizado (enzima imobilizada);
- h) Estudar a possibilidade de utilização da enzima imobilizada em reações de produção de ésteres.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, será apresentada uma revisão sobre os temas relacionados ao objetivo deste trabalho, sendo eles, líquidos iônicos, materiais mesoporosos e enzimas, com ênfase na lipase *Candida antarctica* do tipo B.

3.1 Líquidos Iônicos (LIs)

Líquidos iônicos, originalmente, foram descritos como “*sais fundidos à temperatura ambiente*”, porém o termo “temperatura ambiente” passou a ser questionado pela variação dependendo da época do ano e região. Com o objetivo de solucionar tais questões, foi introduzido o termo “líquidos iônicos”, com a ideia de fornecer no próprio nome a constituição por combinação de íons (cátion assimétrico volumoso com um ânion fracamente coordenante) e quebrar o preconceito que tais substâncias eram destinadas apenas a usos em altas temperaturas. Logo, observa-se um equívoco na terminologia empregada, pois podem ser incluídas na classe dos líquidos iônicos as substâncias com ponto de fusão abaixo de 100 °C (WASSERSCHEID; KEIM, 2000; WEI; IVASKA, 2008; MIGNONI, 2012).

A partir da terminologia e justificativas expostas acima, neste trabalho será utilizado o termo “sólidos iônicos”, pois os compostos utilizados no estudo são líquidos a altas temperaturas, porém nas temperaturas de síntese dos materiais mesoporosos tipo MCM-48, temperatura ambiente, compreendida entre 23-25 °C, o composto cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio ([C₁₆MI]Cl) e cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio ([C₁₄MI]Cl) encontram-se no estado sólido.

3.1.1 Aspectos históricos

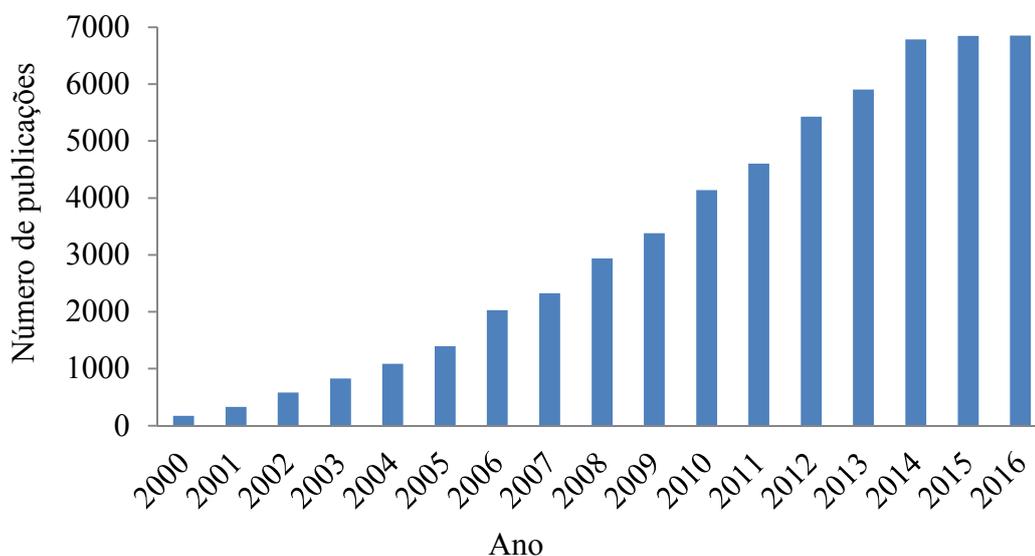
No Quadro 1 está apresentado o histórico dos líquidos iônicos, desde sua descoberta, no final do século XIX, até as pesquisas mais recentes.

Quadro 1 - Histórico do desenvolvimento dos líquidos iônicos

Ano	Marco histórico	Referências
1888	Síntese do nitrato de etanolamônio com ponto de fusão abaixo de 100 °C	Gabriel; Weiner, 1888
1914	Síntese do nitrato de etilamônio com ponto de fusão de 12 °C	Walden, 1914
1951	Síntese de sais contendo o íon cloroaluminato ($\text{AlCl}_4^-/\text{Al}_2\text{Cl}_7^-$) para eletrodeposição do alumínio a baixas temperaturas	Hurley; Wier, 1951
1963	Síntese de um material baseado no ânion clorocuprato e no cátion trietilamônio, composto não volátil a temperatura ambiente	Yoke; Weiss; Tollin, 1963
1967	Síntese do benzoato de tetrahexilamônio (THAB), sal líquido a 25 °C	Swain et al., 1967
1972	Aplicação de LI como meio para catálise homogênea	Parshall, 1972
1979	Desenvolvimento de LI contendo o cátion piridínio e o ânion cloroaluminato, ótimo solvente para estudo eletroquímico de compostos organometálicos e alquilaromáticos	Robinson; Osteryoung, 1979
1985-1986	Estudo de líquidos iônicos como solventes para sínteses orgânicas	Fry; Pienta, 1985 e Boon et al., 1986
1992	Desenvolvimento de uma nova classe de LIs, baseados no cátion 1-etil-3-metilimidazólio e em ânions como o tetrafluorborato, nitrato e sulfato, compostos muito resistentes à umidade	Wilkes; Zaworotko, 1992
1995	Desenvolvimento de misturas ternárias de cloreto de 1-n-butil-3-metilimidazólio, tricloreto de alumínio e halogeneto de alquilalumínio, uso como solventes para dimerização de olefinas	Chauvin; Einloft; Oliver, 1995
2002	Síntese de LI com grupamentos aromáticos e os ânions PF_6^- e $\text{N}(\text{SO}_2\text{CF}_3)^-$ com diferentes números de carbonos espaçadores entre o anel imidazólio e o grupamento fenil	Dzyuba; Bartsch, 2002
2004	Aplicação de líquidos iônicos com o cátion imidazólio como solventes na síntese de zeólitas aluminofosfato	Cooper et al., 2004
2005	Síntese de LI com 1 e 3 carbonos espaçadores e com os ânions brometo e tetrafluorborato	Moret et al., 2005
2006	Síntese de LIs utilizando 1 e 3 carbonos espaçadores e com o ânion trifluorometanosulfonato.	Hsieh et al., 2006
2007	Estudo de LI como solventes e direcionadores de estruturas para síntese de zeólitas	Parnham; Morris, 2007
2011	Estudos com um novo grupo de LI, sais pirílio, contendo uma carga positiva no átomo de oxigênio	Pernak et al., 2011
2014	Síntese e caracterização de um novo LI a base do cátion imidazólio, Dimim [FeBr_4^-]	García-Saiz et al., 2014

Observa-se pelo histórico apresentado no Quadro 1, que ao longo dos últimos 130 anos vários estudos foram realizados sobre esse tema. Em pesquisa realizada na base de dados *Web of Science* (WOS) do *Institut for Scientific Information* (ISI) / Thompson Reuters, compreendendo o período de 2000-2016 (Figura 1), é verificado que nos últimos anos as pesquisas foram muito exploradas e é crescente o número de artigos e publicações sobre o tema.

Figura 1 - Número de publicações contendo o termo “*ionic liquid*”, no título, resumo e palavras-chave, em função do tempo



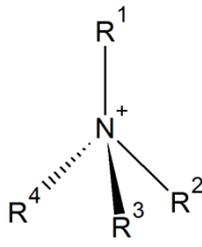
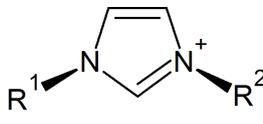
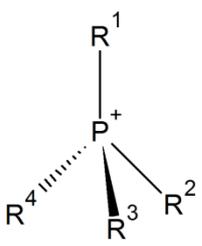
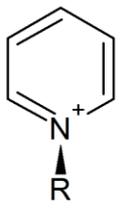
Fonte: Pesquisa realizada na base de dados Thompson Reuters

Observando a Figura 1, é possível evidenciar o acréscimo exponencial em relação aos trabalhos baseados e/ou que utilizaram os mais variados tipos de líquidos iônicos. Entre os anos de 2006 a 2016 a quantidade de publicações aumentou mais de três vezes.

3.1.2 Estrutura e propriedades

Os líquidos iônicos são constituídos exclusivamente por íons, onde os cátions e ânions utilizados determinam as suas propriedades químicas e físicas bem como a sua estabilidade (WEI; IVASKA, 2008). Os cátions e ânions mais utilizados na síntese dos LIs estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais cátions e ânions utilizados na síntese de LI

Cátions			
	Tetraalquilamônio		Imidazólio
	Tetraalquilfosfônio		Piridino
Ânions			
Cl^-	Cloreto	$\text{AlCl}_4^- / \text{Al}_2\text{Cl}_7^-$	Cloroaluminato
Br^-	Brometo	CH_3CO_2^-	Acetato
BF_4^-	Tetrafluorborato	CH_3SO_4^-	Metilsulfato
PF_6^-	Hexafluorofosfato	$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	bis(trifluormetilsulfonyl)imidato
NO_3^-	Nitrato		

(R, R1, R2, R3 e R4 = cadeias alquílicas)

Fonte: Adaptado de Freudenmann et al. (2011)

Os LIs englobam um conjunto de características importantes, tais como, líquidos em uma ampla faixa de temperatura, densidades elevadas, inflamabilidade desprezível, baixa toxicidade (solvente “verde”), boa estabilidade química e térmica, poder catalítico e alta condutividade iônica (WEI; IVASKA, 2008).

Para os compostos formados por cloretos de 1-alkil-3-metilimidazólio, o aumento da cadeia alquílica (de metil a octil) confere a diminuição do ponto de fusão. Analisando os derivados de cadeia metila e butila, observa-se que o LI resultante é sólido à temperatura ambiente, no entanto para cadeias maiores, o LI é líquido, já o aumento da cadeia alquílica causa diminuição da densidade, aumento de viscosidade e hidrofobicidade (POOLE, 2004). Modificações estruturais no cátion (especialmente nas posições 1 e 3 do anel de imidazólio) e no ânion permitem desencadear propriedades como, miscibilidade com água e solventes orgânicos (SCHREKKER et al., 2007), ponto de fusão e viscosidade diferenciadas (LEE, 2006).

3.1.3 Aplicações dos LIs

Devido as suas características e propriedades, há um grande interesse na utilização dos líquidos iônicos baseado nos princípios da Química Verde, visando processos químicos ambientalmente mais limpos e tendo como uma das preocupações a substituição de solventes orgânicos que são bastante voláteis e nocivos, especialmente os organo-halogenados (ANDERSON; ARMSTRONG; WEI, 2006; SHARIFI et al., 2010).

Esses compostos são substitutos promissores para solventes orgânicos comuns em inúmeras reações orgânicas, em processos de extração, em cromatografia e em estudos eletroquímicos, bem como têm se mostrado eletrólitos ideais para dispositivos eletroquímicos como baterias e capacitores (ANDERSON; ARMSTRONG; WEI, 2006; WEI; IVASKA, 2008; BUZZEO; EVANS; COMPTON, 2004; MONIRUZZAMAN et al., 2010; GHILANE et al., 2008). No Quadro 2 estão apresentadas algumas das aplicações dos líquidos iônicos.

Quadro 2 - Aplicações dos líquidos iônicos

Área	Aplicação
Lubrificantes e aditivos	Lubrificantes Aditivos para combustíveis
Analítica	Solventes para cromatografia gasosa Cristalização de proteínas
Solventes	Biocatálise Reações orgânicas e catalíticas Síntese de nanopartículas Polimerização
Cristais líquidos	Monitores
Acumulador de calor	Fluídos térmicos
Separação	Destilação Extração Membranas Separação de gases

Fonte: Adaptado de Aldrich (2005)

3.1.4 Líquidos iônicos contendo o cátion imidazólio

Os LIs, principalmente os derivados do cátion imidazólio, apresentam uma grande variação nas suas propriedades físico-químicas em função do ânion, dos substituintes presentes no anel imidazólio e também das interações fracas presentes na molécula. A

estrutura desses compostos é dominada basicamente por ligações de hidrogênio fracas entre cátion e ânion, interações do tipo empilhamento entre os anéis aromáticos e interações do tipo van der Waals entre as cadeias alifáticas. No entanto, o conhecimento sobre suas propriedades físicas e químicas é ainda limitado e o grande número de diferentes combinações de cátions e ânions intensifica ainda mais o problema. Propriedades como ponto de fusão, densidade, viscosidade, condutividade iônica e miscibilidade em água podem ser ajustadas pela variação dos cátions e ânions, visando encontrar as características adequadas para determinada aplicação (FRANZOI et al., 2011).

As aplicações de líquidos iônicos sintetizados a partir do cátion imidazólio são numerosas e encontradas em várias áreas, tais como, extração e processos de separação (DUPONT; CONSORTI; SPENCER, 2000), química sintética (DUPONT; CONSORTI; SPENCER, 2000), catálise (PÂRVULESCU; HARDACRE, 2007), nanopartículas de metais de transição (OTT; FINKE, 2007), ciência dos materiais (KLINGSHIRN et al., 2005), eletroquímica (WASSERSCHIED; WELTON, 2007) e síntese de materiais zeolíticos (MORRIS et al., 2014; SACHSE et al., 2015; LOPES et al., 2015).

Devido suas inúmeras aplicações e características importantes, neste trabalho propomos a utilização de líquidos iônicos contendo o cátion imidazólio em sua estrutura combinado com o ânion cloreto. Foi variado o tamanho da cadeia lateral de carbonos ligada ao anel imidazólio de quatorze e dezesseis carbonos (C_{14} e C_{16}).

3.2 Materiais zeolíticos e mesoporosos

A seguir serão descritos os materiais zeolíticos e mesoporosos, desde seu descobrimento até as sínteses mais recentes.

3.2.1 Histórico

Alex Fredrick Cronstedt, mineralogista sueco, em 1756, divulgou a descoberta de uma nova classe de minerais naturais que eliminavam água quando aquecidos com a chama de um maçarico. Estes materiais foram nomeados de zeólitas, palavra de origem grega que significa “pedra que ferve” (TURRO, 1986).

Entre 1756 até o início de 1930 as zeólitas foram pouco estudadas. Os avanços na área compreenderam a descrição de novas espécies e descoberta de suas propriedades, tais como,

desidratação reversível, troca iônica, sorção de gases e líquidos iônicos e efeito de peneira molecular (MACEDO, 2007).

As zeólitas classificam-se em naturais e sintéticas, sendo que as de ocorrência natural apresentam algumas limitações, como: impurezas indesejáveis, composição variável (dependendo o depósito) e propriedades catalíticas não otimizadas (MACEDO, 2007).

Em 1948 e 1956 foram realizados trabalhos pioneiros quanto à síntese de zeólitas e também em relação às propriedades de catálise (BRECK et al., 1956). A primeira publicação de patente desses materiais surgiu em 1959 (CUNDY; COX, 2003).

Entre 1950 e 1960 foram sintetizadas e comercializadas várias zeólitas contendo maiores teores de silício. Em 1962, zeólitas sintéticas foram introduzidas em escala industrial no craqueamento catalítico em leito fluidizado de destilados de petróleo bruto (WEITKAMP, 2000). Em 1960, ocorreu o Encontro Nacional de Química Inorgânica da *American Chemical Society*, onde houve a publicação da primeira descrição do mecanismo de síntese de zeólitas pelos autores Edith Flanigen e Donald Breck, os quais elucidaram a formação do gel aluminossilicato e as etapas de nucleação e crescimento dos cristais zeolíticos (CUNDY; COX, 2003).

Ainda na década de 60, foi explorada a síntese dos materiais com maiores concentrações de silício, através do uso de compostos orgânicos, como amina, sal ou hidróxido de amônio quaternário. Esses compostos são conhecidos como agentes direcionadores de estrutura ou *templates* (moldes) e também agem como contraíons impondo uma restrição à densidade de carga da estrutura, resultando em produtos com maior proporção de Si/Al. Os compostos podem ser removidos da estrutura por calcinação produzindo materiais com poros abertos para utilização em sorção e catálise (CUNDY; COX, 2003; CUNDY; COX, 2005).

Taramasso, Perego e Notari (1983), descreveram a síntese do titaniossilicato TS-1 sintetizado empregando como agente direcionador de estrutura o hidróxido de tetrapropilamônio (TPAOH), o produto mostrou ser um catalisador muito útil para reações de oxidação.

Comin (2010) estudou o uso de líquidos iônicos como direcionadores de estrutura na síntese de zeólitas beta, processo inovador que dispensou o uso de solventes orgânicos na síntese de tais materiais. Mignoni et al. (2010) também utilizaram líquidos iônicos como direcionadores de estrutura na síntese de zeólitas e os materiais obtidos foram empregados em reações catalíticas de oligomerização de etileno.

Materiais zeolíticos tipo TON e TiO_2 -TON foram sintetizados utilizando líquidos iônicos como direcionadores de estrutura e apresentaram excelentes resultados (MORRIS et al., 2014; LOPES et al., 2015).

3.2.2 Formação e ocorrência de zeólitas naturais

As zeólitas de ocorrência natural são formadas com base na precipitação de fluidos contidos nos poros, tal como nas ocorrências hidrotermais ou pela alteração de materiais vulcânicos. As condições de temperatura, pressão, atividade das espécies iônicas e de pressão parcial da água são fatores determinantes na formação das diferentes espécies de zeólita (LUZ, 1994).

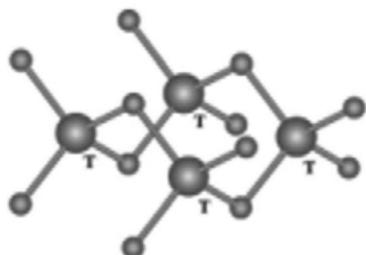
A maioria dos depósitos de zeólitas são encontrados em ambientes geológicos salino ou lagos alcalinos, solos alcalinos, diagenético, sistema aberto, hidrotermal e sedimentos marinhos (CLIFTON, 1987; LUZ, 1994). Os diferentes tipos de zeólitas naturais formadas são diretamente dependentes das fontes de SiO_2 (dióxido de silício) e Al_2O_3 (óxido de alumínio) dos depósitos, das características físico-químicas dos fluidos geológicos, da temperatura e do tempo de depósito (MIGNONI, 2012).

3.2.3 Estrutura e classificação

Inicialmente as zeólitas foram definidas como uma classe de materiais aluminossilicatos hidratados de metais alcalinos ou alcalinos terrosos, principalmente sódio, potássio, cálcio e magnésio. Essa definição foi ampliada e passou a englobar qualquer estrutura tridimensional com átomos coordenados tetraedricamente (átomos T) um com o outro através de átomos de oxigênio compartilhados e com uma densidade estrutural menor que 21 átomos T por 1.000 \AA^3 (LUNA; SCHUCHARDT, 2001; BAERLOCHER; MCCUSKER; OLSON, 2007).

As zeólitas são estruturadas em redes cristalinas tridimensionais compostas de unidades primárias e unidades secundárias de construção. As unidades primárias de construção são compostas de tetraedros do tipo TO_4 ($T = \text{Si, Al, B, Ge, Fe, P, Co}$) unidos nos vértices pelo átomo de oxigênio como demonstrado na Figura 2 (LUNA; SCHUCHARDT, 2001).

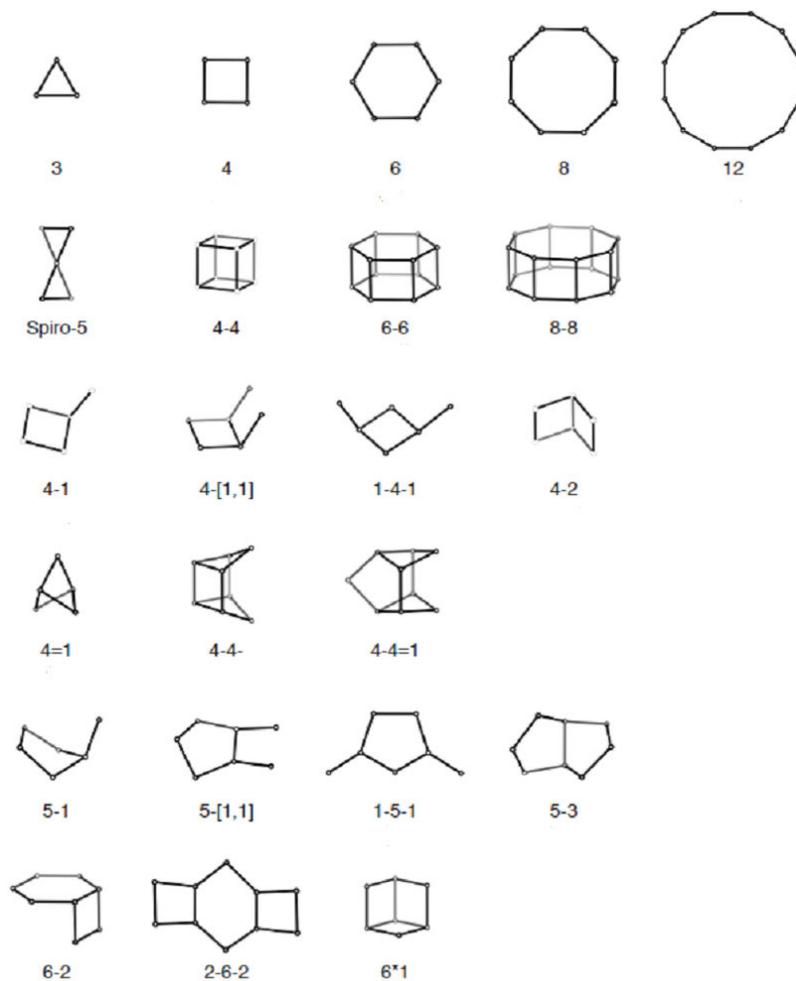
Figura 2 - Unidades primárias de construção



Fonte: Luna; Schuchardt (2001)

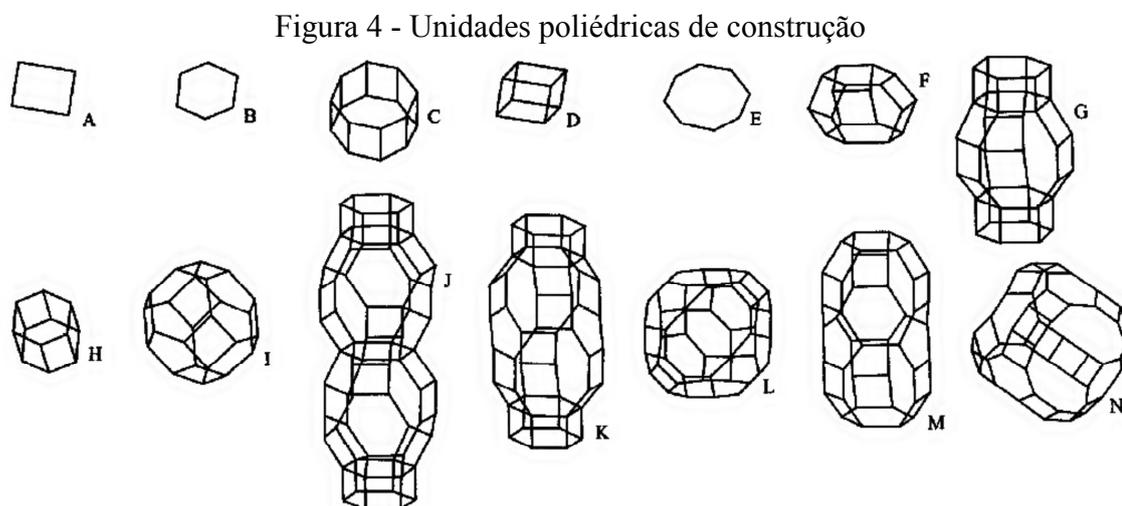
As unidades secundárias de construção, apresentadas na Figura 3, são 16 unidades compostas de 4 a 16 átomos T e, quando ligadas, podem formar diversos tipos de redes cristalinas (GHOBARKAR; SCHAF; GUTH, 1999; BAERLOCHER; MCCUSKER; OLSON, 2007).

Figura 3 - Unidades secundárias de construção



Fonte: Baerlocher; McCusker; Olson (2007)

A união das unidades secundárias de construção formam estruturas denominadas de unidades poliédricas de construção, contendo canais e poros interconectados (GIANNETTO, 1990), conforme ilustrado na Figura 4.



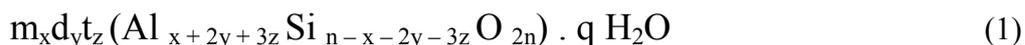
A = 4-anéis, B = 6-anéis, C = gaiola δ , D = gaiola 4-4, E = 8-anéis, F = gaiola ϵ , G = gaiola γ , H = gaiola 6-6, I = gaiola sodalítica, J = gaiola levina, K = gaiola chabazita, L = gaiola α , M = gaiola erionita, N = supergaiola faujasita

Fonte: Giannetto (1990)

As estruturas zeolíticas apresentam canais e cavidades interconectadas de dimensões moleculares geralmente inferiores a 10 Å que podem ser preenchidas por água, sais e íons de compensação, conferindo assim propriedades de troca iônica e seletividade catalítica. Sua estrutura é classificada como microporosa e confere as zeólitas uma superfície interna muito grande, quando comparada a sua superfície externa. Assim, quanto maior a estrutura microporosa, maior será a mobilidade dos reagentes em seu interior, proporcionando uma maior atividade catalítica, podendo reconhecer, discriminar e organizar moléculas com tamanhos inferiores a 1 Å com muita precisão (SMART; MOORE, 1995; LUNA; SCHUCHARDT, 2001).

Os materiais porosos, de acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), são divididos em três classes conforme o tamanho de seus poros: microporos (diâmetro inferior a 2 nm), mesoporos (diâmetro entre 2 e 50 nm) e macroporos (diâmetros maiores que 50 nm) (ROUQUEROL et al., 1994).

A Equação 1 é utilizada para expressar a composição das mais diferentes estruturas das zeólitas.



Onde, m , d e t representam cátions mono, di ou trivalentes, respectivamente; x , y e z correspondem à quantidade dos cátions mono, di ou tri valentes, respectivamente; n corresponde ao número de tetraedros de Si; e q ao número de moléculas de água (GIANNETO, 1990).

Quanto à classificação e nomenclatura, a IUPAC e IZA (*International Zeolite Association*) recomendam a utilização de um código mnemônico de três letras, por exemplo, MOR (mordenita) e FAU (faujasita). O tipo de estrutura é independente da composição elementar e da distribuição dos átomos incorporados. Para estruturas interrompidas, o código de três letras é precedido por hífen, por exemplo, -CLO (cloverita), e para materiais intercrescidos, o asterisco representa a estrutura de um hipotético membro final, por exemplo, *BEA (beta) (McCUSKER; LIEBAU; ENGELHARDT, 2001).

3.2.4 Aplicações industriais

Segundo Clifton (1987), a estrutura das zeólitas confere propriedades de grande importância para os processos industriais, como: alto grau de hidratação, baixa densidade e grande volume de canais uniformes quando desidratada, estabilidade da estrutura cristalina, propriedades de troca catiônica, condutividade elétrica, adsorção de gases e vapores e propriedades catalíticas.

As principais aplicações dos materiais zeolíticos e também materiais mesoporosos estão relacionadas à catálise, adsorção e troca iônica, sendo que se destacam nas diversas áreas industriais, como: refino, petroquímica e química (GIANNETTO, 1990; CORIOLANO et al., 2015), na formulação de detergentes como adsorvente (SUTILI et al., 2009), adsorção seletiva de biopolímeros (MATSUI et al., 2001), descontaminante de águas (MORENO; QUEROL; AYORA, 2001), fluido supercrítico e líquidos iônicos (GLASER, 2007), remoção de metais pesados (SHINZATO, 2007; DA'NA; SAYARI, 2012) e suportes para imobilização enzimática (HUDSON et al., 2005; MACARIO et al., 2007; PARK et al., 2009; CALGAROTO et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2012).

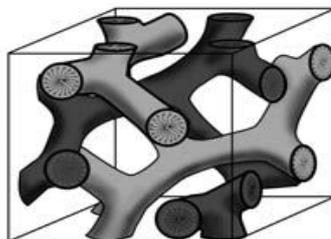
3.2.5 Materiais mesoporosos

Conforme mencionado no item 3.2.3, as zeólitas pertencem ao grupo de materiais microporosos, família de aluminossilicatos cristalinos em que os microporos são arranjos regulares de canais com tamanhos uniformes (BAERLOCHER; MCCUSKER; OLSON, 2007). Em 1992, cientistas da *Mobil Company* conseguiram chegar a uma nova família de peneiras moleculares, com estruturas semelhantes às zeólitas, porém classificadas como mesoporosas, designadas de M41S. Essa nova classe de materiais compreende três mesoestruturas bem definidas, sendo MCM-41, com arranjo hexagonal de poros unidimensionais, MCM-48, com arranjos tridimensionais de poros cúbicos e MCM-50, com estrutura lamelar (VARTULI et al., 1994; HOFFMANN et al., 2006).

3.2.5.1 Materiais mesoporosos do tipo MCM-48

A peneira molecular de fase cúbica, MCM-48, é o segundo material mais estudado da família M41S, sendo o primeiro a MCM-41. Apresenta um arranjo cúbico de mesoporos com cela unitária de simetria cúbica, $Ia3d$, com um arranjo de canais tridimensionais, com duas redes contínuas interpenetrantes de canais quirais (HOFFMANN et al., 2006; YATES et al., 2006), com mesoporos uniformes de 2 nm (WANG et al., 2012). A Figura 5 ilustra um modelo para a estrutura mesoporosa cúbica do MCM-48.

Figura 5 - Estrutura MCM-48



Fonte: Hoffmann et al. (2006)

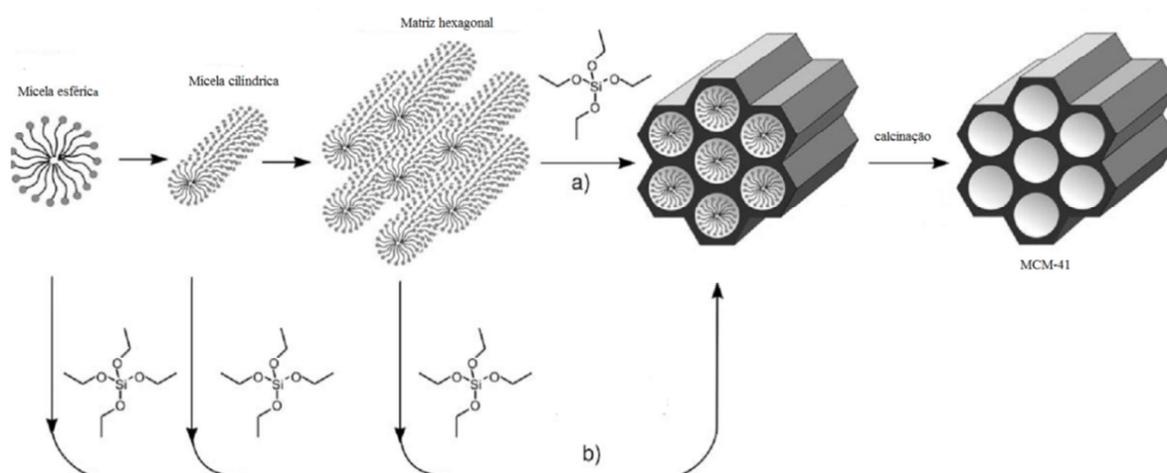
Os sólidos mesoporosos do tipo MCM-48 são materiais com maior potencial para aplicação em catálise em comparação com a MCM-41, devido sua cinética de transferência de massa mais favorável (ZHANG et al., 2012). Outra aplicação do material MCM-48 é como suporte para imobilização enzimática (PING et al., 2004, ZHAO; SHI; MA, 2005).

3.2.6 Síntese dos materiais mesoporosos da família M41S

A formação de silicatos mesoporosos está relacionada ao fenômeno de agregações supramoleculares de surfactantes, o que provê o molde para a estrutura porosa de uma matriz inorgânica. Quando o surfactante está acima da concentração micelar crítica (CMC) produz arranjos hexagonais empacotados, e abaixo da CMC produz arranjos lamelares. A formação das fases dos materiais da família M41S, portanto, depende da razão molar surfactante/silício (NAIK; GHOSH, 2009).

O primeiro mecanismo proposto para a síntese de materiais da família M41S é o *Liquid Cristal Templating* (LCT), conforme ilustrado na Figura 6, que consiste na deposição de precursores inorgânicos sobre as micelas cilíndricas da fase líquida cristalina pré-formadas. Após o precursor é condensado na forma sol-gel formando uma estrutura orgânica/inorgânica, contendo micelas do surfactante inseridas numa matriz de sílica com arranjo hexagonal. Quando os surfactantes são removidos por extração ou calcinação é gerada uma estrutura de mesoporos abertos (NAIK; GHOSH, 2009).

Figura 6 - Mecanismo de formação de MCM-41: a) iniciado por cristais líquidos, b) iniciado por sílica (TEOS)

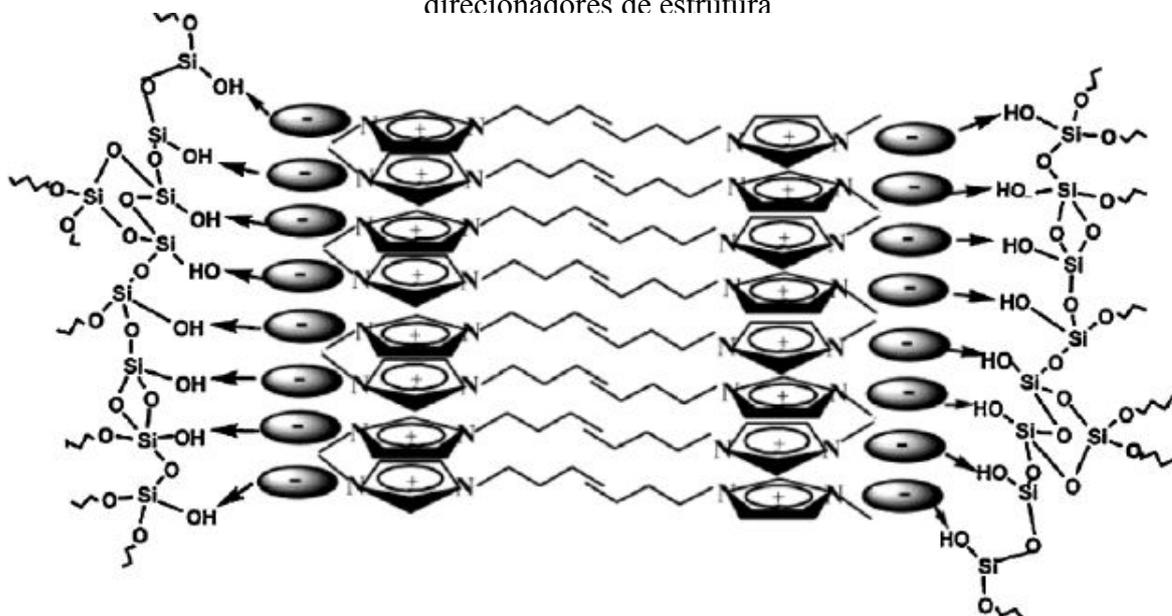


Fonte: Adaptado de Beck et al. (1992)

A utilização de líquidos iônicos como direcionadores de estrutura representa uma nova opção para a síntese de sílicas e materiais mesoporosos (Figura 7). Devido às suas propriedades físico-químicas singulares, os materiais sintetizados possuem morfologias e propriedades interessantes que não são acessíveis pelo uso de solventes convencionais como a

água e solventes orgânicos (MA; YU; DAI, 2010; CAI; WANG; HAN, 2011; SACHSE et al., 2015).

Figura 7 - Modelo proposto para formação de material mesoporoso utilizando LI como direcionadores de estrutura



Fonte: Adaptado de Ma; Yu; Dai (2010)

Na Figura 7 observa-se que no modelo proposto, os ânions interagem com os grupos silanóis, orientando as moléculas ao longo do poro e formando interações π - π adjacentes entre os anéis aromáticos.

3.2.6.1 O papel de cada reagente na síntese

Para a síntese dos materiais da família M41S quatro reagentes são essenciais, sendo eles: fonte de sílica, agente mineralizante, solvente e direcionador de estrutura. O direcionador de estrutura é considerado uma peça chave para a formação dos materiais (SCHWANKE et al., 2016). A seguir está descrito o papel de cada reagente.

3.2.6.1.1 Fonte de sílica

Atua na construção das paredes do material mesoporoso, estando diretamente relacionada à estabilidade térmica e mecânica. As fontes de sílica comerciais mais utilizadas são a sílica pirolisada, silicato de sódio e tetraetilortosilicato (TEOS). Existem também fontes

de sílica alternativas que são utilizadas com o objetivo de redução de custos, sendo elas: metacaulim, cinzas de carvão, cinzas de casca de arroz, diatomita e pucimita (SCHWANKE et al., 2016).

3.2.6.1.2 Agente mineralizante

Possuem a função de mineralizar as matérias primas de sílica em espécies solúveis capazes de se associarem as moléculas de surfactante. Os mais empregados são hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) (SCHWANKE et al., 2016).

3.2.6.1.3 Direcionador de estrutura

É o reagente mais importante na síntese dos materiais, interage duplamente e controla o tamanho do poro. Contém um grupo hidrofílico-cabeça, carregado positivamente “*head group*” e uma cauda carregada negativamente “*tail group*”. São solúveis em solventes apolares e parcialmente em água. Esses compostos dissolvem-se em água a partir de uma concentração micelar crítica (CMC), onde as micelas podem agregar-se em esferas, cilindros ou em forma de bicamadas ou lamelas (SCHWANKE et al., 2016).

3.3 Enzimas

As enzimas são uma importante classe das proteínas, e como todas as proteínas, são heteropolímeros formadas por subunidades de aminoácidos (entre 62 a 2500), unidas por ligações covalentes entre si, através do grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro aminoácido, constituindo cadeias polipeptídicas extensas, com um arranjo espacial e estrutural complexo. Algumas incluem em sua estrutura um componente não proteico, designado grupo prostético (VOET; VOET, 1995; BORZANI et al., 2001). Podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal, obtidas por meio de processos fermentativos ou por trituração de tecidos vegetais e animais (BACHA et al., 2005; JOSÉ; PRADO, 2005).

São consideradas como catalisadores naturais que aceleram a velocidade das reações, alcançando valores de até 10^{12} superiores as reações não catalisadas (VOET; VOET, 1995).

Segundo Palmer (1995), esta função catalítica está relacionada à capacidade de interação enzima-substrato, pois as enzimas possuem uma região ativa e uma parte de estrutura proteica que possibilita a catálise enzimática, assim o substrato liga-se a região ativa da enzima permitindo a atividade catalítica.

Para que a catálise ocorra os reagentes (substratos) ligam-se as moléculas da enzima em uma região específica de sua superfície, o sítio ativo. O sítio ativo é uma cavidade com forma definida, aberta na superfície da molécula globular, constituída por grupos R de aminoácidos. É esta forma definida do sítio ativo que confere a especificidade de cada enzima a um substrato. A relação espacial entre substrato e enzima não deve ser vista como um modelo rígido de chave-fechadura, esta aproximação altera o balanço de forças responsáveis pela estrutura tridimensional da enzima, moldando sua forma a forma do substrato, fazendo assim com que a enzima adquira uma nova conformação tensionada e distorcida (BORZANI et al., 2001).

As enzimas de maior aplicação industrial são as proteases, lipases, celulasas, xilanasas e fitases (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007), dentre essas se destacam as lipases por catalisarem diversas reações em sistemas orgânicos com baixo teor de água (esterificação, interesterificação, aminólise, lactonização) e também por apresentarem alta estabilidade (KIM; YOUN; SHIN, 2006; YIN; LIU; TAN, 2006).

3.4 Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) podem ser encontradas em tecidos de vários animais e vegetais, e podem ainda ser produzidas por fermentação a partir de diversas espécies de micro-organismos, tais com os *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp, *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Tulopsis* sp e *Candida* sp. As lipases provenientes de micro-organismos são as que apresentam maior interesse em aplicações industriais (DUMITRIU et al., 2003; CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

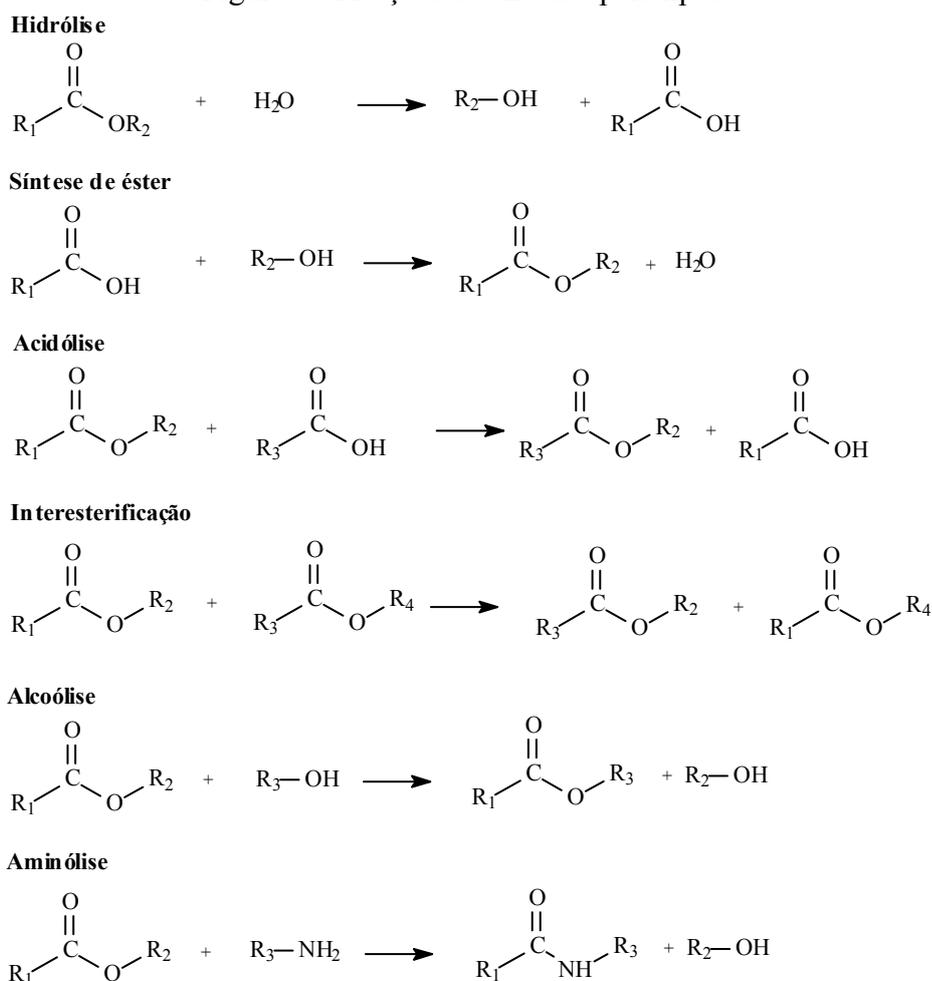
O sítio ativo das lipases consiste em três resíduos de aminoácidos: um resíduo nucleofílico (cisteína, serina, ou aspartato), um resíduo ácido catalítico (aspartato ou glutamato), e um resíduo de histidina (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Possuem como características massa molecular variando 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, geralmente

com atividade ótima na faixa entre 30 a 40 °C. O ponto isoelétrico (pI) varia em uma faixa de pH entre 3,6 e 7,6, sendo a maioria em pH entre 4 e 5 (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; KIRK; CHRISTENSEN, 2002).

Essas enzimas são os biocatalisadores mais versáteis e eficientes empregados, devido sua alta atividade e estabilidade. Além da versatilidade, as lipases são biodegradáveis, régio-específicas e apresentam baixa toxicidade o que permite a obtenção de produtos com elevado grau de pureza sem causar impactos ambientais (JAEGER; EGGERT, 2002). Possuem como função natural catalisar a hidrólise de cadeias longas de triglicerídeos insolúveis em meio aquoso, mas podem ainda ser usadas em muitas outras reações, conforme ilustrado na Figura 8 (PALOMO et al., 2002; TRODLER; PLEISS, 2008; IDRIS; BUKHARI, 2011), destacando-se a síntese de ésteres.

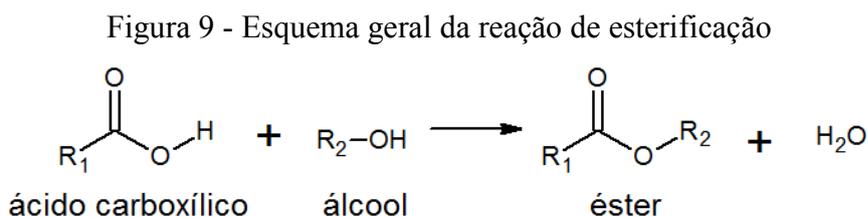
Figura 8 - Reações catalisadas pela lipase



Fonte: Adaptado de Villeneuve et al. (2000)

3.4.1 Utilização de lipases para produção de ésteres

Os ésteres de ácidos graxos são encontrados na indústria em produtos como aromas, sabão, medicamentos, perfumes e cosméticos. A síntese de ésteres tradicionalmente baseia-se na esterificação de ácidos carboxílicos com álcool, conforme ilustra a Figura 9, ocorre na presença de catalisadores inorgânicos a elevadas temperaturas (>100 °C), demandando grande quantidade de energia, além de serem reações lentas. Assim, tornam-se necessários métodos mais eficientes, principalmente para processos de obtenção de ésteres aromáticos. O emprego de lipases como biocatalisadores em tais reações permite condições reacionais mais brandas, ocorrendo na presença ou ausência de solventes, com altas produtividades e ainda os produtos obtidos podem ser caracterizados como aromas naturais (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004; SOUZA, 2013).



O oleato de etila (síntese entre ácido oleico e etanol), por exemplo, é um éster usado como biodiesel, também como aditivo de combustível diesel e nas indústrias de cosméticos e de alimentos (BLOOMER; ADLERCREUTZ; MATTIASSON, 1992; YAHYA; ANDERSON; YOUNG, 1998; FORESTI; FERREIRA, 2005). Outros ésteres de baixo peso molecular também desempenham papéis importantes na indústria, sendo utilizados, principalmente, como constituintes de sabor e aromas. Exemplo desses compostos são o butirato de etila e butirato de metila, importantes componentes de muitas frutas, como: abacaxi, maracujá, morango e maçã (SOUZA, 2013).

Outros ésteres que podem ser sintetizados a partir de reações catalisadas por lipases e são considerados naturais, aumentando assim seu interesse, são aqueles produzidos a partir do geraniol, um álcool terpênico, naturalmente encontrado em óleos essenciais de diversas plantas aromáticas, de grande importância nas indústrias de aromas e fragrâncias (XIONG et al., 2014). Exemplos de ésteres obtidos a partir desse álcool são o butirato de geranila e acetato de geranila.

O butirato de geranila possui fórmula molecular $C_{14}H_{24}O_2$, peso molecular de 224,34 g/mol, é encontrado na natureza e tem um odor frutado, característico ao de cereja. É usado como um agente de sabor e aroma, podendo ser sintetizado utilizando lipases em sistemas com solventes ou sistema livre de solvente (SHIEH; AKOH; YEE, 1996; KARRA-CHAABOUNI et al., 2002) e ainda utilizando lipases livres ou imobilizadas (CLAON; AKOH, 1993; MOLINARI; MARIANELLI; ARAGOZZINO, 1995).

O acetato de geranila de fórmula molecular $C_{12}H_{20}O_2$, peso molecular 196,29 g/mol, é o mais comum e valioso éster do geraniol, tem um sabor frutado de limão doce e fragrância de rosa e lavanda, podendo ser utilizado em alimentos. Pode ser obtido por esterificação direta do ácido acético e geraniol (XIONG et al., 2014).

Os diferentes tipos de lipases podem apresentar diferentes especificidades em relação ao comprimento da cadeia dos ácidos graxos empregados nas reações (UPPENBERG et al., 1994). As lipases produzidas por *Candida* sp, destacam-se quanto à eficiência de suas aplicações e são enzimas bem estabelecidas para fins de biocatálise, especialmente a lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (MARIA et al., 2005).

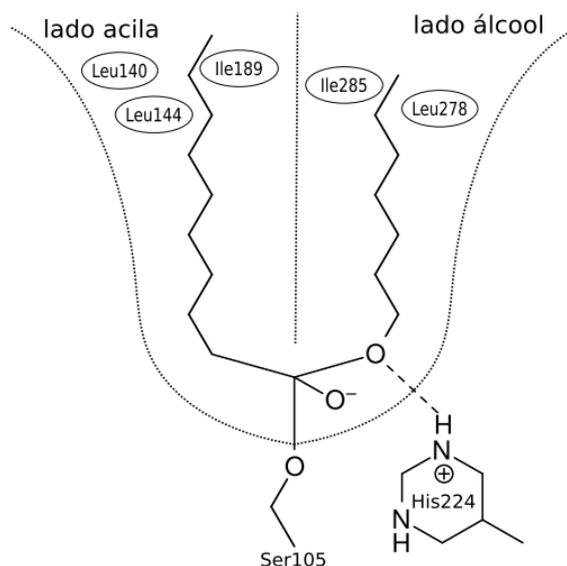
3.4.2 Lipase de *Candida antarctica* B (CALB)

Pertence à família das α/β hidrolases, com um sítio catalítico apresentando o mesmo mecanismo reacional das outras lipases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999), são constituídas por 317 resíduos de aminoácidos, e possuem dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å, com peso molecular de 33 kDa e pI em pH 6,0 (UPPENBERG et al., 1994). A cavidade ligante (“sítio ativo”) para o substrato é elíptica, com formato de um funil, com paredes bastante hidrofóbicas, contudo no sítio ativo há apenas uma pequena área hidrofóbica, o que favorece a não formação de camadas sobrepostas de moléculas por essa enzima. O sítio ativo da enzima é dividido em duas partes, um lado para ligações acila e a outra para ligações com álcoois, conforme mostra a Figura 10 (TRODLER; PLESS, 2008).

A CALB apresenta potenciais aplicações na indústria alimentícia, de detergente, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e oleoquímica (HASAN; SHAH; HAMMED, 2006). Contudo, o uso dessa enzima na forma livre apresenta limitações para aplicações industriais, pois são moléculas complexas, altamente sensíveis e sua exposição a determinadas condições como temperaturas extremas ou solventes orgânicos, pode conduzir à desnaturação e à perda concomitante de atividade, bem como a impossibilidade de recuperação e reutilização. Diante

disso, as enzimas livres apresentam dificuldade de recuperação e reuso o que incrementa os custos econômicos do processo, além de promover a contaminação do produto com atividade enzimática residual. Essas dificuldades e limitações podem ser solucionadas pelo uso dessas enzimas na sua forma imobilizada, permitindo o reuso desse biocatalisador várias vezes, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIM, 2009; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

Figura 10 - Sítio ativo da *Candida antarctica* B (CALB)



Fonte: Trodler; Pleiss (2008)

3.5 Imobilização enzimática

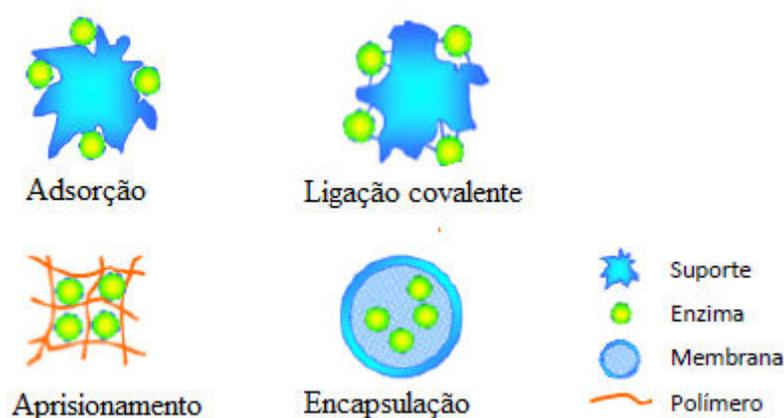
A imobilização enzimática oferece várias vantagens operacionais em relação às enzimas livres, como a escolha do tipo de processo (batelada ou contínuo), tempo reduzido de reações, controle na formação de produtos, fácil remoção da mistura reacional e adaptação de vários desenhos de reatores, além de aumentar a estabilidade operacional reduzindo assim os custos (ADRIANO et al., 2005). As técnicas de imobilização e as condições empregadas durante a imobilização, tipo do suporte, natureza do solvente e variações de reatores podem influenciar nas propriedades da enzima imobilizada. Essas condições podem ser modificadas de acordo com a reação (IDRIS; BUKHARI, 2011).

O principal interesse em imobilizar enzimas é para melhorar suas propriedades e obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo

quando comparado à enzima em sua forma livre, bem como a recuperação e reutilização do derivado imobilizado (SOARES et al., 2002; MATEO et al., 2007).

Os métodos para imobilização de enzimas mais conhecidos e importantes são divididos em duas classes: (a) imobilização da enzima no interior de um suporte por aprisionamento ou encapsulação e (b) imobilização da enzima na superfície do suporte por adsorção, ligação covalente ou ligação covalente cruzada (MACARIO et al., 2007; VASCONCELLOS, 2010). Alguns métodos de imobilização estão ilustrados na Figura 11.

Figura 11 - Principais métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de Salleh; Rahman; Basri (2006)

A adsorção, deposição da enzima sobre um suporte sólido, é o método mais simples de imobilização física da enzima, sendo obtida uma atividade muito próxima da enzima livre. As principais vantagens desse método são o baixo custo e a facilidade no processo de imobilização. Devido às ligações serem fracas, são facilmente desfeitas, assim parâmetros com temperatura, pH e força iônica devem ser severamente controlados. Esse é o principal problema relacionado a este tipo de imobilização (MACARIO et al., 2007; VASCONCELLOS, 2010).

A imobilização por ligação covalente é baseada na retenção da enzima na superfície do suporte por ligações entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do suporte. A desvantagem desse método está na perda de parte da atividade enzimática devido às alterações nas conformações dos sítios ativos da enzima que podem ocorrer durante a ligação (ROCHA; GIL; GARCIA, 1998).

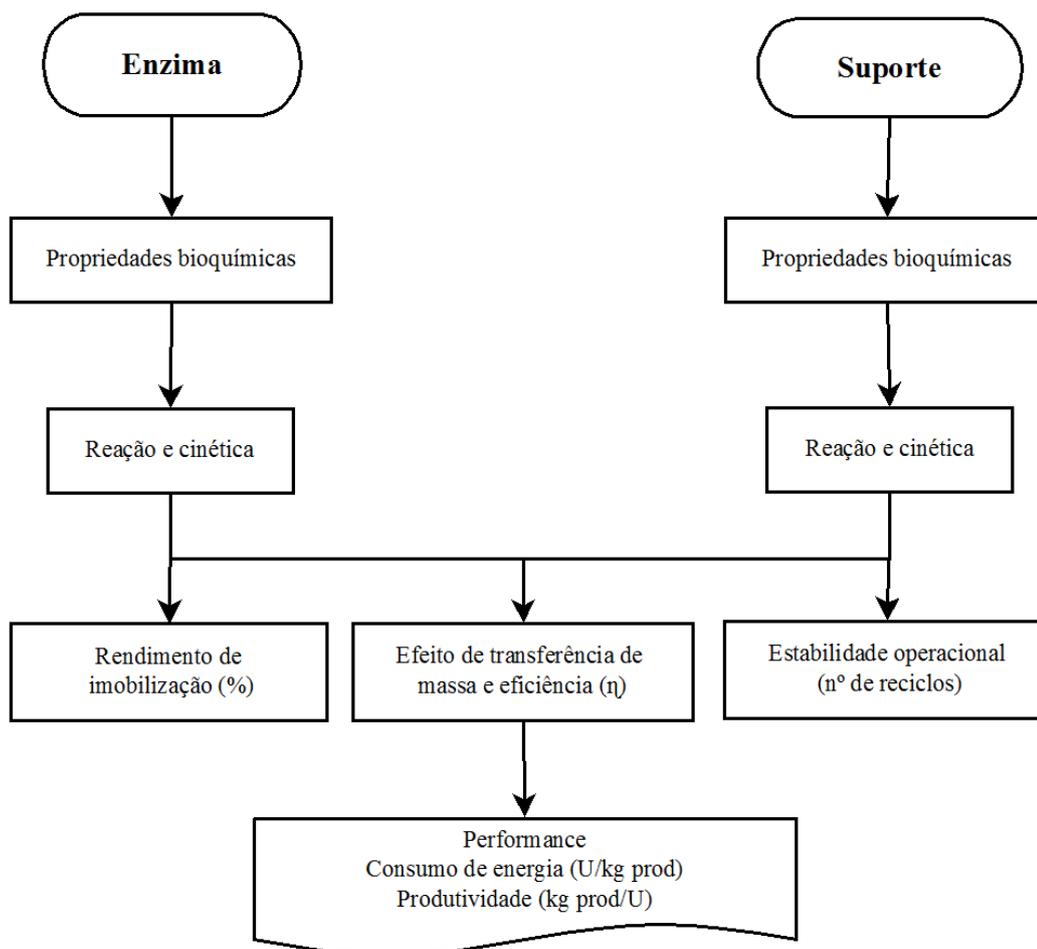
A ligação covalente cruzada (*cross-linking*) consiste na formação de um sistema reticulado de moléculas de enzima, que forma uma rede rígida. A principal vantagem é a formação de uma ligação mais forte, porém, pode ocasionar a formação de barreiras difusionais. Esta técnica necessita de agentes que induzem a ligação cruzada, como por exemplo, o glutaraldeído e o álcool polivinílico (FERRER et al., 2000).

O método de aprisionamento baseia-se na retenção física da enzima no interior do suporte, de maneira a permitir a livre difusão do substrato e dos produtos da reação. Este método normalmente envolve a sintetização *in situ* de uma matriz porosa em torno dos biocatalisadores (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013), ou seja, a síntese do suporte deve ser realizada na presença da enzima mantendo-a confinada e protegida. A principal vantagem desse método é que ele praticamente não induz alterações conformacionais da enzima, prevenindo-a da inativação catalítica durante a imobilização e/ou no processo de catálise. Por outro lado, esse método pode ocasionar limitações de transferência de massa e comprometer o desempenho catalítico da enzima imobilizada (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). Os suportes mais utilizados para imobilização através desse método são: sílica, poliuretano, náilon, nitrato de celulose, acetato de celulose, resinas, colágeno e policarbonatos (SOARES et al., 2000).

A imobilização por encapsulamento está associada à inclusão de biocatalisadores em membranas semipermeáveis, que impõe uma barreira física às enzimas, mas não restringe sua mobilidade no núcleo das membranas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

Para que o processo de imobilização seja efetivo a escolha do suporte ideal torna-se fundamental, pois este deve permitir o livre acesso dos substratos à enzima, além de manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Também deverá ser estável em uma ampla faixa de pH, resistente a solução salina, aos reagentes utilizados no processo de ativação, bem como as condições reacionais. Deve ser fisicamente estável, com certa rigidez mecânica e, principalmente com baixo custo de preparação, para assim aumentar a viabilidade de aplicação industrial (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004). Portanto, a interação entre o suporte e a enzima irá fornecer ao derivado imobilizado as suas propriedades bioquímicas, mecânicas e cinéticas, conforme ilustra a Figura 12.

Figura 12 - Fatores que afetam o desempenho de enzimas imobilizadas



Fonte: Adaptado de Carvalho; Lima; Soares (2015)

Lipases imobilizadas tornam-se cada vez mais úteis para os processamentos biotecnológicos, com isso diversas técnicas e diferentes suportes têm sido empregados para imobilização dessas enzimas. A imobilização sobre materiais hidrofóbicos e hidrofílicos têm apresentado bons resultados, como, por exemplo, em partículas porosas de kaolinita, resinas macroporosas, zeólitas e esferas de SiO₂ funcionalizadas em nanoescala (MACARIO et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que lipases adsorvidas em suportes hidrófobos exibem uma hiper ativação em comparação com a enzima livre devido à ativação interfacial, causada por uma alteração conformacional resultante da adsorção (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; PALOMO et al., 2002).

3.5.1 Imobilização enzimática em suportes zeolíticos e mesoporosos

Um processo que vem sendo estudado, com sucesso, há mais de duas décadas e combina as vantagens dos catalisadores heterogêneos e enzimáticos é a utilização de materiais zeolíticos e mesoporosos como suportes para imobilização enzimática (GONÇALVES et al., 1996; GONÇALVES et al., 1997; SERRALHA et al., 1998; YIU, WRIGHT; BOTTING, 2001; PING et al., 2004; MA et al., 2004; ZHAO; SHI; MA, 2005; HUDSON et al., 2005; MACARIO et al., 2007; CALGAROTO et al., 2011; LEI et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2012).

A imobilização nesses suportes torna-se possível pelos materiais apresentarem propriedades interessantes, como facilidade de modulação, comportamento hidrofílico/hidrofóbico, caráter ácido/base, resistência mecânica e química, morfologia e tamanho do cristal favorável, grande área superficial pelo tamanho do poro, permitindo assim livre difusão de substratos e produtos de reação. Contudo a principal vantagem é a fácil dispersão e recuperação dos suportes em meios líquidos (MACARIO et al., 2007).

O método mais empregado para imobilização enzimática em suportes zeolíticos e mesoporos é por adsorção (MACARIO et al., 2007; CALGAROTO et al., 2011; VASCONCELLOS et al., 2012; MANGRULKAR et al., 2012). Porém, devido à fragilidade da ligação que ocorre, a enzima pode ser facilmente lixiviada do suporte prejudicando sua reutilização, conforme comprovam os estudos realizados por Macario e colaboradores (2007).

3.6 Considerações Finais

Conforme informações apresentadas no decorrer deste capítulo, percebe-se que há um grande interesse na imobilização da CALB, devido seu amplo potencial de aplicações em reações de interesse industrial.

Ao nosso conhecimento, até o momento, não há trabalhos publicados na literatura que realizam a imobilização enzimática em suportes mesoporosos do tipo MCM empregando a técnica *in situ*, com a adição da enzima durante a síntese do material. A partir do emprego dessa metodologia é possível o aprisionamento da enzima no interior da rede cristalina e consequentemente dificultando sua lixiviação para o meio.

Além disso, não foram encontrados relatos na literatura quanto à utilização dos sólidos iônicos [C₁₆MI]Cl (cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio) e [C₁₄MI]Cl (cloreto de 1-

tetradecil-3-metilimidazólio) como agentes direcionadores de estrutura para síntese do material MCM-48. Assim, torna-se inédita a imobilização enzimática *in situ* em suporte mesoporoso do tipo MCM-48 empregando os sólidos iônicos [C₁₆MI]Cl e [C₁₄MI]Cl como direcionadores de estrutura e que poderão atuar também como aditivos no processo de imobilização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados para a síntese dos sólidos iônicos, dos suportes para imobilização enzimática (MCM-48), e posteriormente sua caracterização, medidas de atividade através de reações de esterificação do ácido oleico e produção de ésteres. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Ambiental e Laboratório de Biotecnologia da URI-Erechim, com exceção das análises de ressonância magnética nuclear e área específica de adsorção/dessorção de N₂ que foram realizadas no Laboratório de Reatividade e Catálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.1 Materiais utilizados

Para síntese dos sólidos iônicos foram utilizados os seguintes reagentes: 1-metilimidazólio (99 %, Aldrich), 1-clorotetradecano (98 %, Aldrich), 1-clorohexadecano (95 %, Aldrich), acetonitrila (99,5 %, Vetec) e acetato de etila (99,5 %, Vetec).

Para síntese dos suportes foram utilizados: tetraetilortosilicato (TEOS) (98 %, Aldrich), hidróxido de amônio P.A (Quimex), álcool etílico P.A (99,5 %, Merck) e água deionizada.

A enzima utilizada na imobilização foi a lipase comercial de *Candida antarctica* do tipo B (Novozyme).

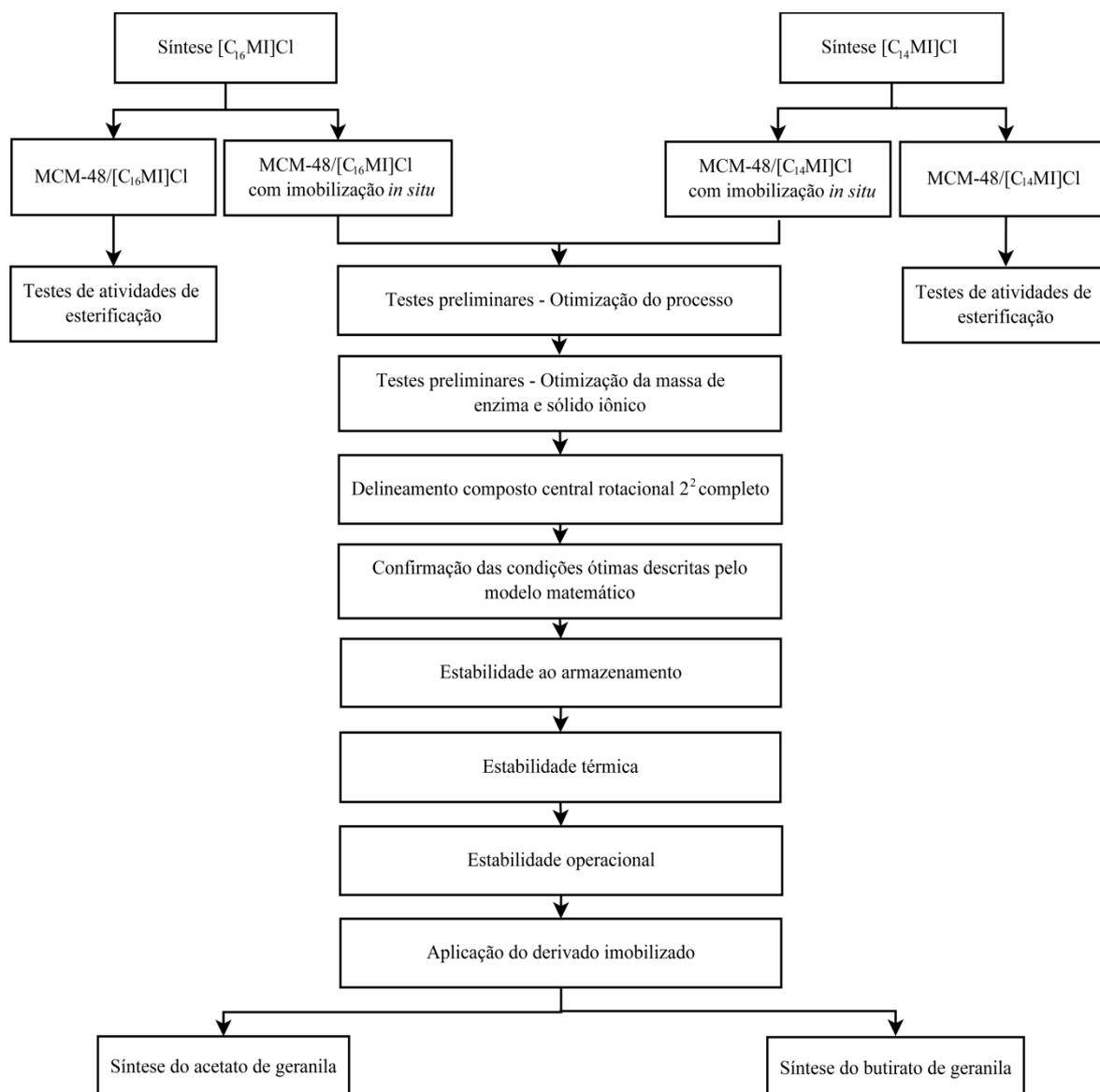
Para determinação da atividade de esterificação foram utilizados: álcool etílico P.A (99,5 %, Merck), acetona (99,5 %, Merck), ácido oleico (65-88 %, Synth), hidróxido de sódio (micro pérola P.A, CRQ) e água destilada.

Para a síntese dos ésteres foram utilizados: álcool etílico P.A (99,5 %, Merck), acetona (99,5 %, Merck), hidróxido de sódio (micro pérola P.A, CRQ), geraniol (97 %, SAFC), ácido acético (99,8 %, Aldrich), ácido butírico (99 %, Vetec), peneiras moleculares 4 Å (Sigma-Aldrich) e água destilada.

4.2 Métodos experimentais

Os experimentos foram conduzidos na ordem apresentada na Figura 13 e detalhados a seguir.

Figura 13 - Fluxograma dos experimentos realizados



4.2.1 Síntese dos sólidos iônicos

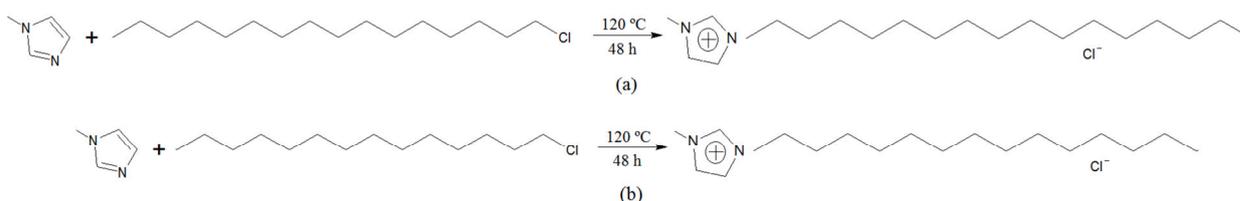
Os sólidos iônicos utilizados nesse estudo são compostos pelo cátion imidazólio e pelo ânion cloreto, com variação do comprimento da cadeia carbônica lateral ligada ao anel imidazólio, conforme características apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características dos sólidos iônicos utilizados

Nomenclatura	Abreviatura	Massa Molar	Fórmula molecular
Cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio	[C ₁₆ MI]Cl	342,99	C ₂₀ H ₃₉ CIN ₂
Cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio	[C ₁₄ MI]Cl	314,94	C ₁₈ H ₃₅ CIN ₂

O cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio e cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio foram sintetizados de acordo com a metodologia descrita por Mignoni (2012). Em um balão de 500 mL foi adicionado 0,2 mol de 1-metilimidazol, 0,2 mol de 1-clorohexadecano ou 0,2 mol de 1-clorotetradecano (dependendo do sólido iônico sintetizado) e 30 mL de acetonitrila. A reação ficou sob agitação magnética e aquecimento a 120 °C, durante 48 h, sob refluxo. Após o término da reação o balão foi resfriado até a temperatura ambiente. A precipitação do [C₁₆MI]Cl ou [C₁₄MI]Cl ocorreu adicionando o líquido formado lentamente em outro balão contendo 500 mL de acetato de etila resfriado em etanol e nitrogênio líquido, após o balão foi levado ao freezer por 24 h para ocorrer a total precipitação do sólido iônico. Ao final do processo, o sólido iônico foi seco sob pressão reduzida até massa constante. A Figura 14 ilustra as reações de síntese dos compostos.

Figura 14 - Reações de síntese dos sólidos iônicos, (a) cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio; (b) cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio



Os sólidos iônicos sintetizados foram utilizados como agentes direcionadores de estrutura na síntese dos suportes enzimáticos. Os procedimentos utilizados nas reações estão descritos a seguir.

4.2.2 Síntese do material mesoporoso MCM-48 e imobilização *in situ*

Inicialmente, realizou-se a síntese do material mesoporoso do tipo MCM-48 sem a presença da enzima, para a realização de testes de atividade de esterificação a fim de

comprovar que o suporte não interfere na atividade catalítica. Posteriormente, foram realizadas as sínteses para imobilização *in situ* da lipase de *Candida antarctica* B (CALB) no material MCM-48.

Levando-se em consideração que a principal vantagem da enzima imobilizada é sua reutilização, é necessário impedir ao máximo sua lixiviação. Pensando nisso, buscou-se com a utilização do método *in situ* a imobilização da enzima por aprisionamento, mantendo a enzima retida no interior do poro do suporte, pois a imobilização ocorre simultaneamente com a formação da rede cristalina do material.

A síntese do material MCM-48 foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Kumar et al. (2001) com adaptações, sendo que foi alterado o direcionador de estrutura utilizado e também o método de lavagem. Os sólidos iônicos (cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio ou cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio), conforme concentrações definidas, foram diluídos em água deionizada (50 mL para as amostras sem enzima e 25 mL para as amostras com enzima imobilizada), sob agitação magnética. Para as amostras com enzima imobilizada, a mesma foi adicionada juntamente com 25 mL de água deionizada. No meio reacional foram adicionados 50 mL de etanol absoluto e 12 mL de hidróxido de amônio (NH₄OH) e deixado em agitação durante 10 min. Em seguida foram acrescentados 3,4 g de tetraetilortosilicato (TEOS) e deixado sob agitação durante 2 h. O produto foi lavado por centrifugação com alíquotas de água deionizada até atingir pH neutro, após foi mantido em repouso a temperatura ambiente por 24 h. As amostras obtidas foram pesadas, trituradas e armazenadas para os posteriores testes reacionais.

4.2.3 Análise e caracterização dos materiais obtidos

4.2.3.1 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os sólidos iônicos sintetizados foram analisados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio utilizando amostras solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) empregando um espectrômetro Varian Inova operando a 300MHz.

4.2.3.2 Análise de difração de raios X

Esta técnica foi utilizada para confirmar a formação das estruturas ordenadas dos materiais do tipo MCM-48 obtidos através de picos característicos.

Os padrões de difração de raios X foram coletados num difratômetro operando com goniômetro tipo D500 Siemens, o qual está equipado com um tubo emissor de cobre, que emite partículas K alpha ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). O gerador opera numa voltagem de 40 kV e corrente 17,5 mA. Todas as amostras passaram por varredura na região de $1^\circ < 2\theta < 8^\circ$ a uma taxa de $0,05^\circ/2s$ e os dados foram analisados através do software Origin.

4.2.3.3 Análise de Área Específica de adsorção/dessorção de N₂

A análise de área específica foi realizada nos suportes obtidos de acordo com o método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938), que se baseia na adsorção e dessorção de um gás, sendo possível a observação das características do material, como porosidade, área específica, entre outros. Para caracterização da porosidade do suporte sem enzima, aproximadamente 200 mg de amostra foi submetida ao processo de calcinação a 700 °C durante 420 min. Para os derivados imobilizados não foi realizado o processo de calcinação. Previamente à adsorção, 20 a 50 mg de cada amostra calcinada foram degaseificadas por 12 h a 350 °C sob vácuo, já para as amostras não calcinadas foi utilizado como pré-tratamento 8 h a 80 °C. As isotermas de adsorção de nitrogênio foram obtidas a 77 K usando um analisador de área superficial e tamanho de poros da marca Quantachrome, modelo Nova 2200e. Áreas específicas foram calculadas a partir da porção linear da plotagem BET. O diâmetro dos poros foi calculado pelo método BJH enquanto o volume dos poros foi obtido do máximo de adsorção de isotermas.

4.2.4 Determinação da atividade de esterificação

As atividades de esterificação foram determinadas para os suportes sem enzima, para a enzima livre e para os derivados imobilizados.

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação de síntese do oleato de etila utilizando ácido oleico e álcool etílico na razão molar de 1:1 (m/m), denominado mistura padrão, conforme descrito por Ferraz et al. (2012). A reação foi iniciada pela adição de

aproximadamente 0,1 g de amostra (suporte sem enzima, enzima livre ou derivado imobilizado) em 5 mL da mistura padrão (ácido oleico e etanol 1:1). A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados a 40 °C, em agitador orbital a 180 rpm, durante 40 min. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de solução acetona-etanol (1:1) (v/v). A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,05 M até o meio atingir pH 11. Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da mistura padrão e 15 mL da solução de acetona-etanol, a titulação também foi realizada com NaOH 0,05 M até pH 11.

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

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

Onde:

AE: Atividade de esterificação (U/g);

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

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

M: Molaridade da solução de NaOH;

V_f: Volume final de meio reacional (mL);

t: Tempo (minutos);

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

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

4.2.5 Determinação do rendimento da imobilização

O rendimento de imobilização foi calculado de acordo com Ficanha et al. (2015), pela porcentagem da razão entre a atividade total de esterificação do derivado imobilizado e a atividade de esterificação total vinculada à massa de enzima livre adicionada na etapa de imobilização, conforme Equação 3.

$$R(\%) = \frac{AE_x}{AE_o} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

AE_x : Atividade total de esterificação do derivado imobilizado (U/g);

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

4.2.6 Estudos preliminares para imobilização enzimática

Experimentos preliminares foram realizados com a finalidade de estudar o sistema de imobilização e assim escolher a melhor metodologia, a forma de condução do processo de imobilização e a definição dos valores para compor pontos dos planejamentos de experimentos.

Inicialmente, com testes realizados a partir do suporte MCM-48 sintetizado utilizando 2 % do sólido iônico $[C_{16}MI]Cl$, buscou-se otimizar os parâmetros do processo de imobilização enzimática. Foi avaliada a melhor etapa do processo para a adição da enzima (0,1 g) e a maneira de adicioná-la ao meio reacional, se pura ou diluída em solução tampão fosfato pH 7. Ambos os parâmetros foram analisados em relação à atividade de esterificação e ao rendimento do derivado imobilizado.

Também foram realizados, para cada derivado imobilizado, testes com diferentes quantidades de enzima e sólido iônico para definição dos valores a serem utilizados nos planejamentos de experimentos.

4.2.7 Delineamento experimental

Para avaliação mais precisa da influência das variáveis sobre a atividade de esterificação foi realizado um delineamento composto central rotacional 2^2 completo (DCCR), com quatro pontos fatoriais, quatro axiais e três centrais. Para cada derivado imobilizado foi realizado uma matriz de experimentos utilizando como variáveis independentes X_1 : sólido iônico (% - em relação à massa total dos reagentes); X_2 : massa de enzima (g). Os níveis de

variações e as variáveis independentes para cada derivado imobilizado estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Os resultados da atividade de esterificação obtidos no planejamento de experimentos foram verificados através da análise de variância e metodologia de superfície de resposta utilizando o modo *Experimental Design* do *Software Statistica 5.0*.

Tabela 3 - Variáveis independentes e níveis de variação (valores reais e codificados) para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração do sólido iônico (%) - X ₁	0,59	1	2	3	3,41
Massa da enzima (g) - X ₂	0,059	0,1	0,2	0,3	0,341

Tabela 4 - Variáveis independentes e níveis de variação (valores reais e codificados) para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração do sólido iônico (%) - X ₁	1,59	2	3	4	4,41
Massa da enzima (g) - X ₂	0,159	0,2	0,3	0,4	0,441

4.2.8 Confirmação das condições experimentais ótimas descritas pelo modelo

Realizaram-se experimentos em triplicata nas condições ótimas descritas pelo modelo estatístico para confirmação dos níveis de massa de enzima e % de sólido iônico ótimo para obtenção da máxima atividade de esterificação. Após a confirmação, as amostras foram utilizadas para os testes posteriores.

4.2.9 Testes de estabilidade

4.2.9.1 Estabilidade de estocagem

A estabilidade de estocagem dos derivados imobilizados e da enzima livre foi realizada à temperatura ambiente (20-25 °C) e em refrigeração de geladeira (3-5 °C). A atividade de esterificação foi acompanhada quinzenalmente, até a perda de 50 % da atividade

inicial dos derivados imobilizados e da enzima livre. Os resultados foram apresentados em porcentagem da atividade residual, calculadas pela Equação 4:

$$AR(\%) = \frac{AE^i}{AE^0} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

AE^i : Atividade de esterificação no tempo “i” (U/g);

AE^0 : Atividade de esterificação no tempo inicial (U/g).

4.2.9.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica dos derivados imobilizados e da enzima livre foi realizada pela reação de esterificação em amostras incubadas em estufa nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C durante 1 h. Após 1 h de incubação foram realizadas as medidas da atividade de esterificação a 40 °C. Os resultados de atividade foram comparados com os resultados obtidos na atividade inicial.

4.2.9.3 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional de reuso foi determinada por reações de esterificação (ácido oleico e etanol, na razão molar de 1:1 (m/m)) por modo contínuo conforme metodologia descrita por Ficanha et al. (2015). Após 40 min de reação, na temperatura de 40 °C e agitação de 180 rpm, o meio reacional (fase líquida) foi removido do sistema com uma pipeta, ficando apenas a fase sólida (derivado imobilizado), então foi realizada nova adição da solução padrão (ácido oleico e etanol) e a amostra foi submetida a uma nova reação. As reações foram repetidas até o derivado imobilizado chegar a uma atividade residual menor ou igual a 50 % da atividade inicial.

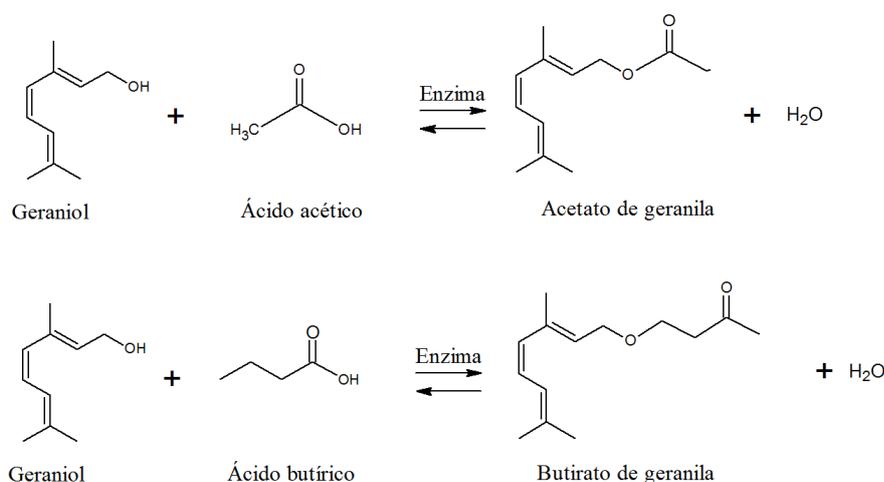
4.2.10 Aplicação da enzima imobilizada na produção de ésteres a partir do geraniol

Foi realizado o estudo da aplicação dos derivados imobilizados na síntese de ésteres utilizando o álcool geraniol e os ácidos acético e butírico, conforme descrito a seguir.

As reações de esterificação enzimática foram realizadas com o preparo de uma solução formada por geraniol e ácido acético (acetato de geranila) ou geraniol e ácido butírico (butirato de geranila) conforme razões molares definidas nos planejamentos de experimentos (Tabela 5). Para iniciar a reação em 5 mL da solução foi adicionado o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl ou enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl de acordo com os valores otimizados, e as concentrações utilizadas foram definidas no delineamento experimental. Nesta etapa foram adicionadas 15 % (m/m) peneiras moleculares em relação à quantidade do substrato. Os experimentos foram realizados em frascos de vidro fechados, com agitação orbital constante de 180 rpm, durante 6 h e sob temperatura de acordo com o delineamento experimental. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de solução acetona-etanol (1:1) (v/v). Após o término do tempo reacional, foi realizada a quantificação da conversão em ésteres por titulação com NaOH 0,05 M até pH 9,3 para o acetato de geranila e até pH 9,4 para o butirato de geranila. Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da solução geraniol e ácido acético ou butírico e 15 mL da solução de acetona-etanol.

As reações de esterificação para produção dos ésteres estudados estão representadas na Figura 15.

Figura 15 - Síntese do acetato de geranila e butirato de geranila



Para analisar a influência das variáveis independentes do processo foi utilizado um delineamento composto central (DCC) 2^3 . As variáveis estudadas foram razão molar (álcool/ácido), concentração da enzima imobilizada (% m/m em relação ao substrato) e temperatura (°C). A Tabela 5 apresenta as variáveis e níveis estudados para a síntese do acetato de geranila e butirato de geranila.

Tabela 5 - Variáveis independentes e níveis de variação (valores reais e codificados) para síntese do acetato e butirato de geranila

Variáveis independentes	Níveis de variação		
	-1	0	+1
Razão molar (álcool/ácido) - X_1	1:1	3:1	5:1
Concentração da enzima imobilizada (%) - X_2	7	10	13
Temperatura (°C) - X_3	40	50	60

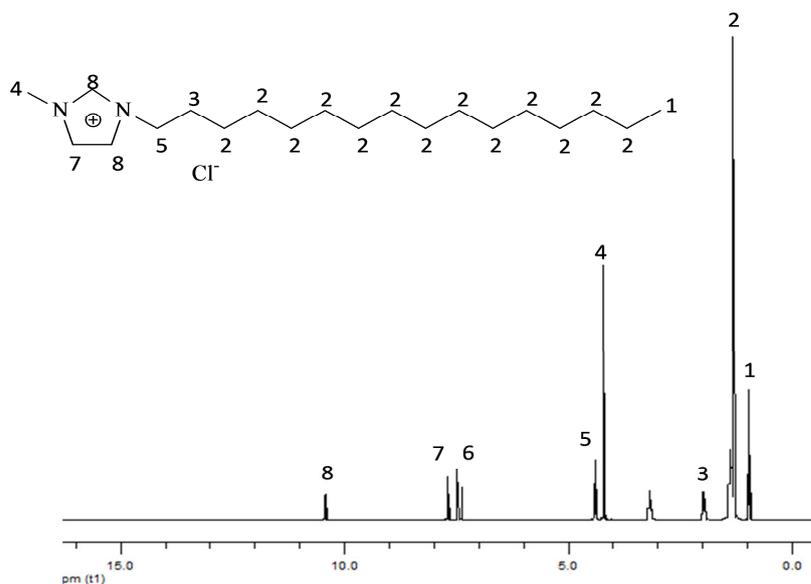
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo referente à imobilização enzimática nos suportes MCM-48 sintetizados a partir dos dois sólidos iônicos estudados ($[C_{16}MI]Cl$ e $[C_{14}MI]Cl$). Para melhor entendimento, o item será dividido da seguinte forma: Inicialmente será apresentada a caracterização dos sólidos iônicos e dos suportes empregados para a imobilização enzimática. Após, os resultados obtidos para atividade de esterificação nos testes preliminares para otimização do processo de imobilização e concentração das variáveis estudadas. Na sequência serão apresentados os resultados obtidos no delineamento composto central rotacional para ambos os suportes, bem como a validação do modelo matemático. Após serão apresentados e discutidos os resultados quanto aos testes de estabilidade (armazenamento, térmica e operacional) dos derivados imobilizados. Para finalizar serão apresentados os resultados das aplicações dos derivados imobilizados em reações para produção de ésteres.

5.1 Caracterização dos sólidos iônicos

Na síntese do $[C_{16}MI]Cl$ foram obtidos 53,06 g (154 mmol) de sólido iônico com um rendimento de 72,61 %. Para verificação da estrutura do material obtido foi realizada análise de RMN de 1H e o resultado está representado na Figura 16.

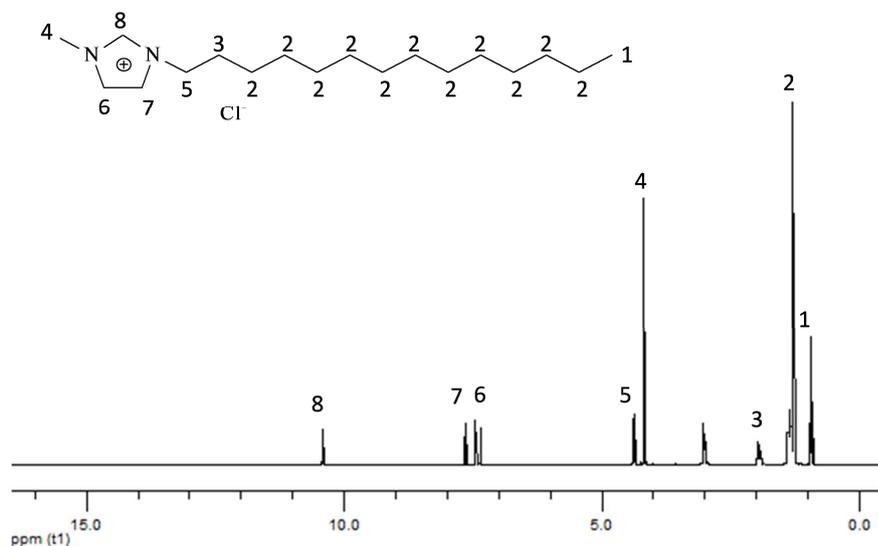
Figura 16 - Análise de RMN 1H do $[C_{16}MI]Cl$



A análise de RMN ^1H do cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio (Figura 16) apresentou o seguinte resultado: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm : 0,94 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz) 1,30-1,38 (m, 26 H), 1,97 (m, 2H), 4,18 (s, 3H), 4,39 (m, 2H), 7,46 (s, 1 H, $H(4)$), 7,66 (s, 1H, $H(5)$), 10,39 (s, 1 H). Os valores e deslocamentos obtidos para o material analisado estão de acordo com o descrito na literatura (HOLBREY; SEDDON, 1999; MIGNONI, 2012), confirmando assim a presença dos hidrogênios ligados ao imidazólio e os que integram a cadeia alifática.

Na síntese do $[\text{C}_{14}\text{MI}]\text{Cl}$ foram obtidos 58,89 g (187 mmol) de material com um rendimento de 87,88 %. Da mesma maneira que o sólido iônico anterior, o $[\text{C}_{14}\text{MI}]\text{Cl}$ foi caracterizado por RMN de ^1H e o resultado está representado na Figura 17.

Figura 17 - Análise de RMN ^1H do $[\text{C}_{14}\text{MI}]\text{Cl}$



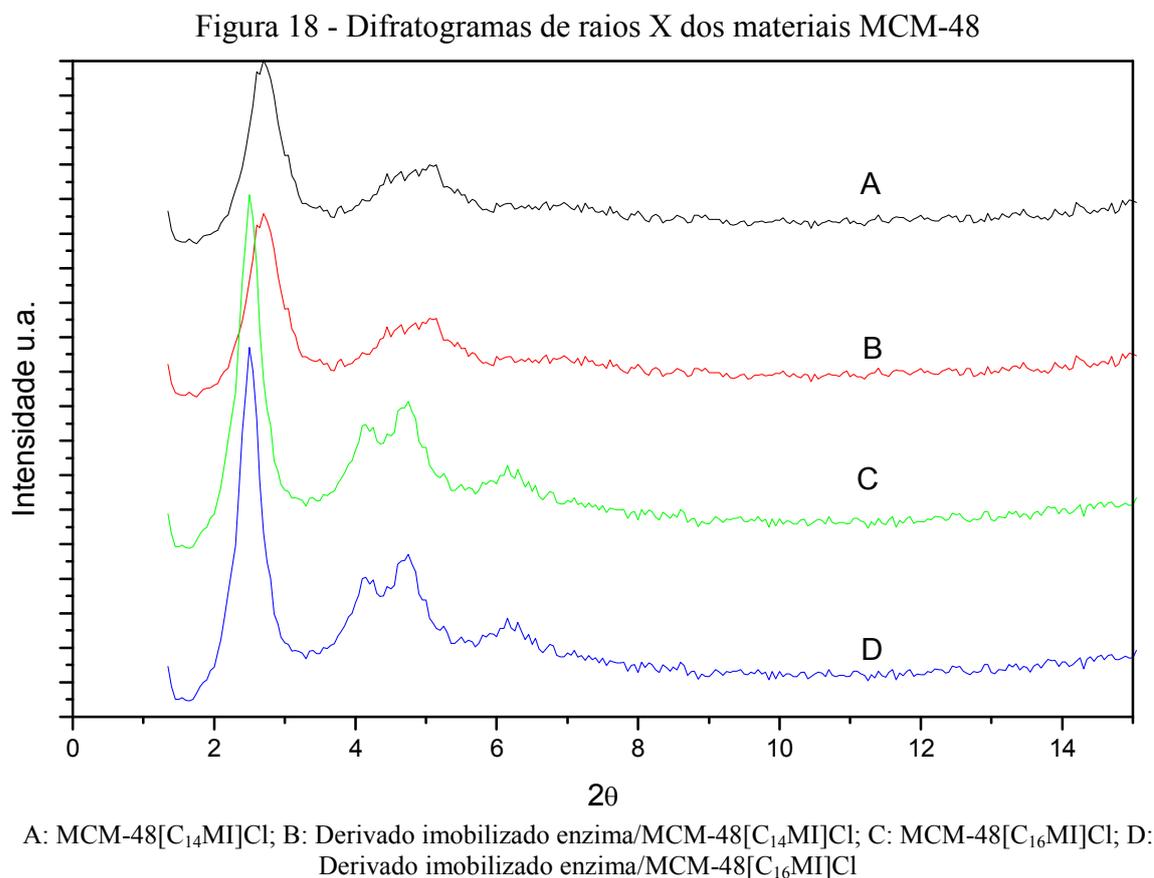
A análise de RMN ^1H do cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio (Figura 17) apresentou o seguinte resultado: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ/ppm : 0,92 (t, 3H, $J = 6,8$ Hz) 1,28-1,37 (m, 22H), 1,94 (m, 2H), 4,18 (s, 3H), 4,43 (m, 2H), 7,34 (s, 1 H, $H(4)$), 7,62 (s, 1H, $H(5)$), 10,38 (s, 1 H). Os resultados experimentais estão de acordo com os resultados encontrados na literatura (HOLBREY; SEDDON, 1999) e novamente confirmam a presença dos hidrogênios ligados ao imidazólio e os que integram a cadeia alifática.

5.2 Caracterização dos suportes

Os materiais mesoporosos do tipo MCM-48 puros e com enzima imobilizada foram submetidos a análises de difração de raios X (DRX) para verificar a estrutura formada, bem como a existência ou não de cristalinidade, assim como também a análise textural para determinar a área específica, utilizando o método BET.

5.2.1 Difração de Raios X

A Figura 18 apresenta os difratogramas de raios X dos materiais MCM-48 sintetizados com os sólidos iônicos $[C_{16}MI]Cl$ e $[C_{14}MI]Cl$ com e sem a presença de enzima.



Observando a Figura 18, é possível evidenciar que os derivados imobilizados sintetizados com os dois sólidos iônicos apresentam o mesmo aspecto em relação aos difratogramas dos suportes sem a presença da enzima. Em todos os difratogramas há presença de picos que caracterizam os materiais como cristalinos. Em comparação com a literatura a

posição (2θ) de todos os picos identifica a fase obtida como sendo característica do material mesoporoso do tipo MCM-48 puro e cristalino (KIM; KIM; RYOO, 1998; SCHUMACHER; GRUN; UNGER, 1999; OLIVEIRA et al., 2014; LEÓN et al., 2015).

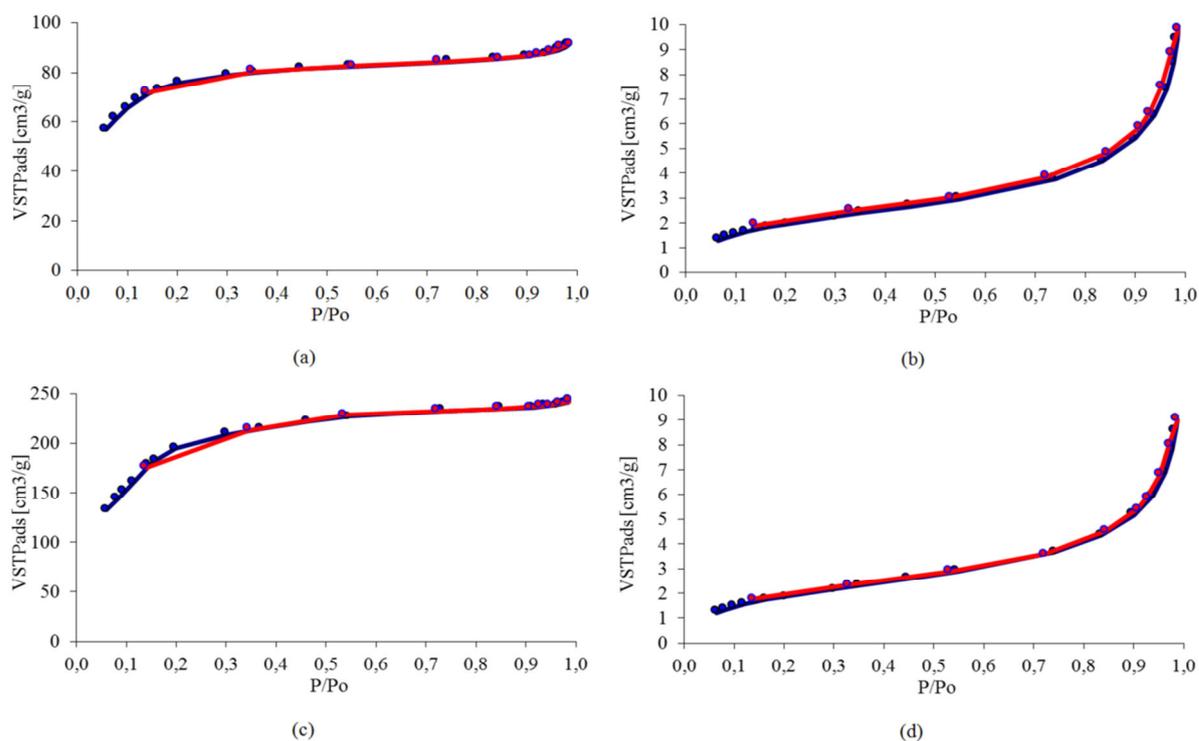
5.2.2 Isotermas de adsorção e dessorção de N_2

A caracterização das propriedades porosas de materiais sólidos é uma questão complexa. Os métodos baseados na adsorção de gás são os mais convenientes para esse estudo, pois relacionam as medições volumétricas das quantidades de gás adsorvido, a partir de uma ampla gama de pressões relativas, gerando curvas formadas entre o volume adsorvido em relação à variação da pressão relativa (p/p_0), a qual é chamada de isoterma de adsorção (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001).

As isotermas de adsorção-dessorção de N_2 , área superficial específica, volume de poros específico (V_p) e diâmetro (d_p) dos suportes com e sem a presença da enzima foram determinados a partir de medições de adsorção-dessorção de nitrogênio, que é um método utilizado para a caracterização de materiais microporosos e mesoporosos. A análise textural mostra os resultados em relação à área de superfície específica (método BET), volume de poros e diâmetro médio dos poros.

Os resultados das análises texturais de adsorção/dessorção de N_2 realizadas para as diferentes amostras, estão apresentados na Figura 19.

Os suportes sem a presença da enzima (Figuras 19a e 19c) apresentaram isotermas do tipo II, na qual a pressão relativa varia pouco e o volume aumenta, indicando a formação de materiais adsorventes com adsorção capilar. Os suportes com a presença da enzima (Figuras 19b e 19d) apresentaram isotermas do tipo III, onde as moléculas do adsorvato apresentam maior interação entre si do que com o sólido, portanto, prejudicando a análise da área superficial e da porosidade. Ambas isotermas são típicas de sólidos com poros razoavelmente grandes (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001; IUPAC, 1985).

Figura 19 - Análise textural de adsorção/dessorção de N₂(a) MCM-48[C₁₄MI]Cl; (b) Derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl; (c) MCM-48[C₁₆MI]Cl; (d) Derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl

A Tabela 6 apresenta as características texturais dos suportes com e sem a presença da enzima.

Tabela 6 - Características dos suportes com e sem a presença da enzima

Suporte	Área específica (m ² .g ⁻¹)	Vol. médio do poro (cm ³ .g ⁻¹)	Tamanho do poro (Å)
MCM-48[C ₁₄ MI]Cl	276,52	0,14	20,30
Enzima/MCM-48[C ₁₄ MI]Cl	7,67	0,01	73,41
MCM-48[C ₁₆ MI]Cl	752,40	0,37	20,13
Enzima/MCM-48[C ₁₆ MI]Cl	7,40	0,01	69,43

A morfologia do poro do material é fundamental, principalmente quando se trata de imobilização enzimática, pois o poro deve ser suficientemente grande para permitir a acomodação da enzima e o livre acesso do substrato. Quanto maior for o poro menor a área superficial do suporte e, conseqüentemente, menor o número de sítios disponíveis para a ligação da enzima (MESSING, 1975).

É possível observar na Tabela 6 que para os suportes sem a enzima imobilizada o material MCM-48 sintetizado com o sólido iônico [C₁₆MI]Cl apresenta maior área específica

e também maior volume de poro. Como poderia ser esperado, tal comportamento é atribuído a maior cadeia carbônica (C_{16}) do sólido iônico utilizado na síntese do material. Comportamento semelhante foi observado por Muller (2013) ao avaliar as propriedades físico-químicas do material mesoporoso tipo MCM-41 usando líquidos iônicos com cadeias de 8 e 16 carbonos.

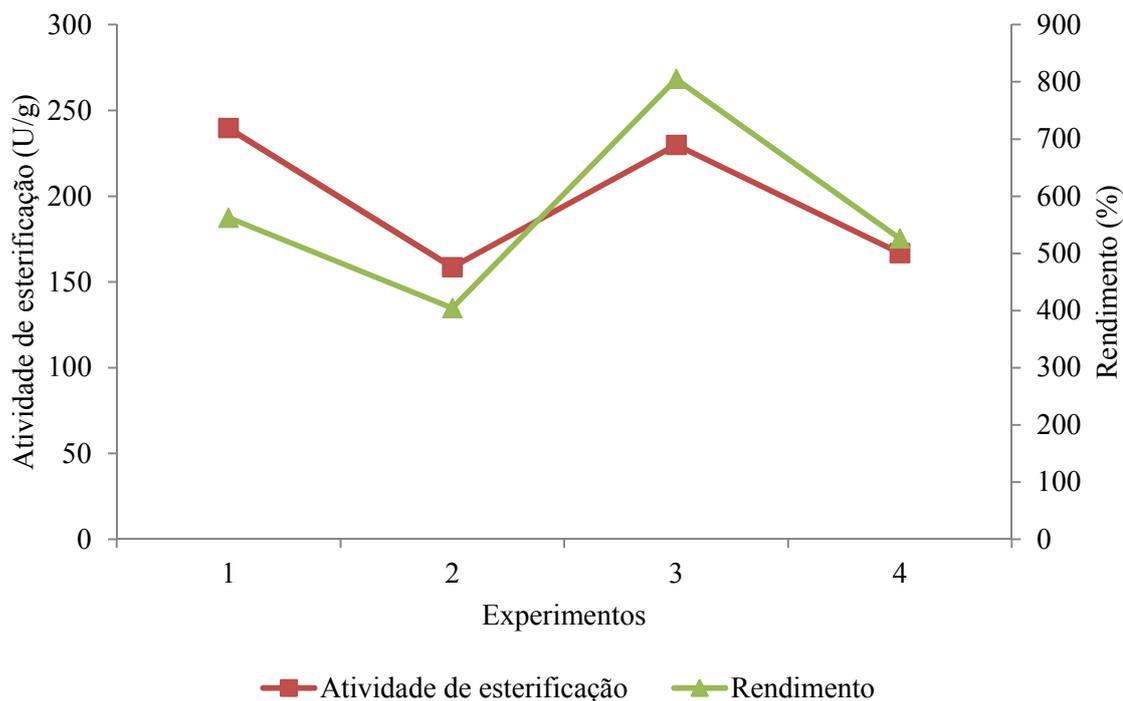
Quanto ao tamanho do poro, todas as amostras analisadas classificam-se, de acordo com a IUPAC (1985), em materiais mesoporosos (tamanho de poro de 20 – 500 Å).

Em relação aos derivados imobilizados, a área específica, o volume e tamanho dos poros apresentam valores similares para os dois suportes. Analisando os suportes com a presença da enzima observa-se uma significativa redução da área específica e volume médio dos poros em comparação com o suporte sem a presença da enzima e, conseqüentemente, ocorre aumento no tamanho dos poros. Essa redução nos valores está relacionada à presença da enzima nos poros do material, ocasionando um preenchimento quase que total dos mesmos, o que dificulta o acesso do gás aos sítios de adsorção, reduzindo assim os valores de área específica. Resultados semelhantes de volume médio de poros foram encontrados por Nascimento et al. (2014) que estudaram as características texturais de MCM-48 sem impregnação e impregnado com níquel.

5.3 Estudos preliminares para otimização do processo de imobilização

Os testes preliminares para a otimização do processo de imobilização foram realizados utilizando o sólido iônico $[C_{16}MI]Cl$. A Figura 20 apresenta a atividade de esterificação e o rendimento obtido pela imobilização da enzima adicionada no início do processo de síntese do material MCM-48, após a diluição do sólido iônico, e durante o processo (no momento da adição do TEOS). Nesses mesmos testes foi avaliada a influência da diluição da enzima em tampão fosfato pH 7 (solução 1:10) nos resultados obtidos.

Figura 20 - Testes preliminares da atividade de esterificação para a otimização do processo



Experimentos: 1- Enzima adicionada no início do processo, diluída em tampão fosfato; 2- Enzima adicionada durante o processo, diluída em tampão fosfato; 3- Enzima adicionada no início do processo, sem diluição; 4- Enzima adicionada durante o processo, sem diluição

As melhores atividades de esterificação, 239,64 e 229,81 U/g, (Figura 20), foram obtidas nas amostras sem a diluição da enzima e com a enzima diluída, respectivamente. Em ambas amostras a adição da enzima ocorreu no início do processo de síntese do material. Os resultados indicaram que a diluição ou não da enzima em tampão fosfato praticamente não interferiu no processo de incorporação e dispersão da enzima no suporte.

Comportamento semelhante foi observado em relação aos rendimentos de imobilização com os ensaios em que a enzima foi adicionada no início do processo, apresentando os maiores rendimentos de 562 e 804 % (sem diluição e com diluição em tampão fosfato, respectivamente). Analisando o rendimento quanto à diluição da enzima, constatou-se que o maior rendimento foi obtido no experimento 3, onde a enzima foi adicionada sem diluição em tampão fosfato.

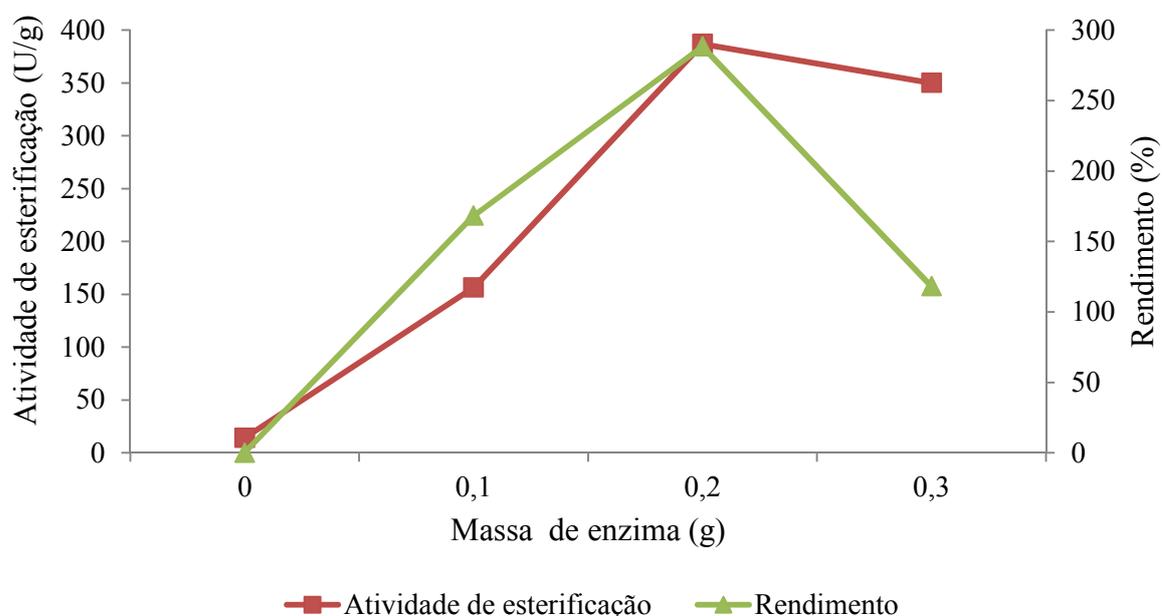
A partir dos testes preliminares foi possível determinar que a melhor etapa para adição da enzima é no início do processo de síntese do material, logo após a diluição do sólido iônico, e a melhor forma de adicionar a enzima ao processo é sem a diluição da mesma em tampão fosfato pH 7.

5.4 Derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl

5.4.1 Testes preliminares – Efeito da quantidade de enzima

Foram realizados testes preliminares de modo que 0,1 a 0,3 g de enzima foram adicionadas ao suporte. Os resultados estão apresentados na Figura 21 que apresenta a atividade de esterificação e o rendimento obtido. Também foram realizados testes com o suporte sem adição da enzima para verificar se o mesmo apresenta atividade de esterificação, e se irá ou não influenciar nos resultados.

Figura 21 - Testes preliminares da atividade de esterificação do derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl em relação à massa de enzima



Verifica-se na Figura 21 que a melhor atividade de esterificação, com 386,97 U/g, foi obtida na amostra em que houve a adição de 0,2 g de enzima. O mesmo comportamento foi observado em relação ao maior rendimento de imobilização, 288 % (0,2 g de enzima).

Valores maiores de massa de enzima (0,3 g) resultaram em menor atividade enzimática e rendimento de imobilização, quando comparados à amostra com 0,2 g de enzima. Souza (2013), ao estudar imobilização da CALB em nanopartículas magnéticas relatou efeito negativo de alta carga enzimática na eficiência de imobilização e mostrou perfil semelhante aos resultados encontrados.

O comportamento apresentado pode ser explicado pela análise das interações entre enzima e o suporte. O aumento da massa da enzima requer maior interação entre proteína-proteína, exigindo uma quantidade ótima de enzima. Aumentando a carga além do ótimo conduz a limitações difusionais, formando uma barreira de difusão de produto e substrato, resultando em menores atividades (SILVA et al., 2012; SOUZA, 2013).

5.4.2 Delineamento experimental

A Tabela 7 apresenta os ensaios realizados para os diferentes valores de sólido iônico $[C_{16}MI]Cl$ (X_1) e massa de enzima (X_2) para síntese do material MCM-48 testados no delineamento composto central rotacional (DCCR). Também estão apresentadas as variáveis codificadas e reais para X_1 e X_2 , assim como os resultados obtidos para a atividade de esterificação.

Tabela 7 - Matriz de experimentos do DCCR 2² e os resultados da atividade enzimática obtidos na imobilização da CALB em MCM-48 $[C_{16}MI]Cl$

Experimento	X_1	X_2	AE (U/g) $\pm \sigma$
1	-1 (1)	-1 (0,1)	162,45 \pm 10,83
2	1 (3)	-1 (0,1)	41,24 \pm 12,99
3	-1 (1)	1 (0,3)	164,36 \pm 18,15
4	1 (3)	1 (0,3)	128,45 \pm 12,36
5	-1,41 (0,59)	0 (0,2)	136,50 \pm 11,87
6	1,41 (3,41)	0 (0,2)	131,34 \pm 21,58
7	0 (2)	-1,41 (0,059)	28,49 \pm 5,03
8	0 (2)	1,41 (0,341)	43,12 \pm 5,62
9	0 (2)	0 (0,2)	337,71 \pm 6,09
10	0 (2)	0 (0,2)	349,18 \pm 53,83
11	0 (2)	0 (0,2)	346,82 \pm 48,87

X_1 : sólido iônico (%); X_2 : massa de enzima (g)

Observa-se na Tabela 7 que fixando o percentual (%) de sólido iônico (X_1) (ensaios 1 e 3; 2 e 4; 7 e 8) e variando a massa da enzima (X_2) do nível -1 para o +1 ocorreu um aumento da atividade de esterificação (AE). No entanto, quando foi fixada a massa da enzima (ensaios 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6) observa-se que com o aumento do percentual de sólido iônico do nível -1 para o +1 ocorreu uma diminuição da atividade enzimática. Esses resultados indicam que a enzima possui um efeito positivo na imobilização enquanto o sólido iônico possui um efeito

negativo. As maiores atividades de esterificação foram encontradas nos experimentos realizados nos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11), sugerindo uma otimização das condições avaliadas.

A partir dos resultados obtidos na análise de variância (APÊNDICE A), é possível a validação do modelo, pois apresentou $F_{\text{calculado}}$ (20,97) maior que o F_{tabelado} (5,05), com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,95. Os dados permitem dessa forma, a apresentação do modelo matemático (Equação 5) obtido pelos valores do coeficiente de regressão (APÊNDICE A) e a construção da superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 22).

Todos os fatores avaliados para a ativação foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) no que se refere à atividade de esterificação dos derivados imobilizados. Houve um efeito linear positivo para massa de enzima e negativo para o sólido iônico e um efeito quadrático negativo para a massa de enzima e sólido iônico. A interação das duas variáveis apresentou um efeito positivo.

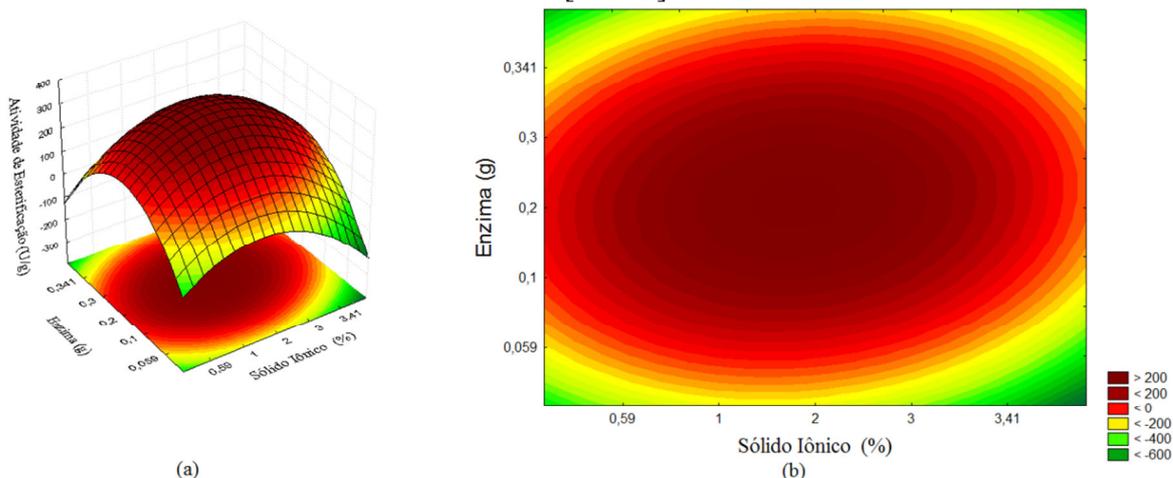
A Equação 5 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade de esterificação para a imobilização em função das variáveis massa de enzima e percentual de sólido iônico.

$$AE = 344,41 - 20,612x_1 - 95,61x_1^2 + 13,76x_2 - 144,96x_2^2 + 21,33x_1x_2 \quad (5)$$

O cálculo dos pontos ótimos da massa de enzima e concentração de sólido iônico para a obtenção da máxima atividade de esterificação foi realizado igualando-se a primeira derivada da atividade de esterificação da massa de enzima e do sólido iônico a zero.

Através da otimização fornecida pela análise estatística e do modelo matemático obtido, pode-se concluir que as máximas atividades de esterificação foram apresentadas nos níveis $-0,103$ para a concentração de sólido iônico e $+0,039$ para a massa de enzima. O que corresponde a valores reais de 1,90 % de sólido iônico e 0,20 g de enzima. Tal tendência também pode ser visualizada pela superfície de resposta e curva de contorno (Figura 22).

Figura 22 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da imobilização da CALB em MCM-48[C₁₆MI]Cl



Com base nos resultados obtidos, foram realizados novos experimentos com a imobilização nas condições otimizadas experimentalmente, exploradas com base no DCCR, a fim de confirmar as variáveis otimizadas. Esse derivado imobilizado foi utilizado para a continuidade do trabalho.

5.4.3 Confirmação das condições experimentais ótimas descritas pelo modelo

A Tabela 8 apresenta os resultados dos experimentos realizados nas condições ótimas descritas pelo modelo estatístico (1,9 % de SI e 0,2 g de enzima) para confirmação dos níveis de massa de enzima e concentração de sólido iônico ótimo para obtenção da máxima atividade de esterificação.

Tabela 8 - Resultados do teste da condição ótima predita pelo modelo para imobilização em MCM-48[C₁₆MI]Cl

Atividade experimental (U/g) $\pm \sigma$	Atividade predita (U/g)	Erro relativo (%)	Rendimento (%)
469,61 \pm 6,79	345,75	26,38	822

A atividade de esterificação experimental obtida na imobilização nas condições ótimas descritas pelo modelo apresentou valor superior ao predito, apresentando um erro relativo de 26,38 %. O rendimento da imobilização também foi calculado e apresentou 822 %.

Os elevados resultados, tanto para atividade de esterificação quanto para o rendimento de imobilização evidenciam que o suporte é eficiente para imobilização enzimática, principalmente devido o tamanho dos seus poros, visto que a atividade da enzima depende da livre acessibilidade do substrato até o sítio ativo da enzima no interior dos canais porosos.

Além disso, os resultados sugerem que os sólidos iônicos, além de possuir função de direcionador de estrutura para o material mesoporoso, podem atuar também como aditivos, apresentando vários efeitos benéficos no processo de imobilização, principalmente na manutenção da atividade catalítica da enzima e no aumento do rendimento.

Carvalho, Lima e Soares (2015) relatam em seus estudos que a presença de líquidos iônicos protege a camada de hidratação ao redor da enzima, evitando sua desnaturação pela presença de álcool. Além de fortalecerem as interações enzima/suporte e melhorarem as propriedades do imobilizado (estabilidade térmica e operacional, capacidade de reutilização, estabilidade de armazenamento e estabilidade em solventes orgânicos).

Souza et al. (2013) ao imobilizarem lipase por encapsulação pela técnica sol-gel, utilizado líquidos iônicos, obtiveram elevados rendimentos de imobilização, os quais foram atribuídos pelo revestimento que o LI proporciona aos poros e à superfície do suporte. Além disso, relatam que o líquido iônico ofereceu proteção à estrutura da lipase, atuando como um agente estabilizador da enzima e protetor contra a inativação pelo álcool durante a encapsulação.

5.5 Derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl

5.5.1 Testes preliminares – Efeito da quantidade de enzima e concentração de sólido iônico

Em um primeiro momento optou-se por utilizar os resultados dos testes preliminares obtidos na síntese do derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl para o planejamento de experimentos na imobilização da enzima no suporte MCM-48[C₁₄MI]Cl, supondo que o comportamento da atividade de esterificação seguiria a mesma tendência. A Tabela 9 apresenta os resultados de atividade de esterificação obtidos utilizando nos pontos centrais os valores de 0,2 g de enzima e 2 % do sólido iônico [C₁₄MI]Cl.

Tabela 9 - Matriz de experimentos do DCCR 2² e os resultados da atividade enzimática obtidos na imobilização da CALB em MCM-48[C₁₄MI]Cl – Teste preliminar

Experimento	X ₁	X ₂	AE (U/g) ± σ	Rendimento (%)
1	-1 (1)	-1 (0,1)	211,76 ± 6,79	198
2	1 (3)	-1 (0,1)	219,61 ± 11,76	236
3	-1 (1)	1 (0,3)	324,16 ± 20,58	318
4	1 (3)	1 (0,3)	371,54 ± 23,08	417
5	-1,41 (0,59)	0 (0,2)	241,67 ± 7,22	203
6	1,41 (3,41)	0 (0,2)	250,00 ± 7,22	327
7	0 (2)	-1,41 (0,059)	110,86 ± 11,47	135
8	0 (2)	1,41 (0,341)	309,09 ± 13,12	376
9	0 (2)	0 (0,2)	141,67 ± 12,50	132
10	0 (2)	0 (0,2)	134,80 ± 7,08	126
11	0 (2)	0 (0,2)	138,89 ± 12,25	130

X₁: sólido iônico (%); X₂: massa de enzima (g)

Ao contrário do esperado, os ensaios realizados para o ponto central não apresentaram os melhores resultados. Observa-se que fixando a quantidade de enzima (ensaios 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6) e variando o percentual de sólido iônico do nível -1 para o +1 ocorreu um aumento na atividade de esterificação. Fixando o percentual (%) de sólido iônico (ensaios 1 e 3; 2 e 4; 7 e 8) e aumentando a quantidade de enzima do nível -1 para o +1 também ocorre aumento nos valores obtidos. Esta análise indica que para obtenção da máxima atividade de esterificação a partir desse derivado imobilizado deve-se elevar a quantidade de enzima e de sólido iônico acima dos valores que foram fixados no ponto central desse planejamento. Nesse sentido, optou-se por realizar um novo planejamento de experimentos.

O teste de atividade de esterificação com o suporte sem adição da enzima não apresentou valores para atividade de esterificação, comprovando assim que o mesmo não influencia nos resultados obtidos.

5.5.2 Delineamento experimental

A Tabela 10 apresenta os ensaios realizados para os diferentes valores de sólido iônico [C₁₄MI]Cl (X₁) e massa de enzima (X₂) para a síntese do derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl testados no delineamento composto central rotacional (DCCR). Também estão apresentadas as variáveis codificadas (X₁ e X₂), assim como os resultados obtidos na imobilização.

Tabela 10 - Matriz de experimentos do DCCR 2² e os resultados da atividade enzimática obtidos na imobilização CALB em MCM-48[C₁₄MI]Cl

Experimento	X ₁	X ₂	AE (U/g) ± σ
1	-1 (2)	-1 (0,2)	193,18 ± 16,07
2	1 (4)	-1 (0,2)	213,34 ± 35,38
3	-1 (2)	1 (0,4)	203,57 ± 54,74
4	1 (4)	1 (0,4)	260,42 ± 63,39
5	-1,41 (1,59)	0 (0,3)	180,21 ± 5,89
6	1,41 (4,41)	0 (0,3)	229,50 ± 43,71
7	0 (3)	-1,41 (0,159)	148,68 ± 16,29
8	0 (3)	1,41 (0,441)	207,93 ± 75,90
9	0 (3)	0 (0,3)	365,64 ± 28,41
10	0 (3)	0 (0,3)	366,67 ± 46,02
11	0 (3)	0 (0,3)	367,42 ± 5,36

X₁: sólido iônico (%); X₂: massa de enzima (g)

Observa-se na Tabela 10 que fixando o % de sólido iônico (X₁) (ensaios 1 e 3; 2 e 4; 7 e 8) e variando a massa da enzima (X₂) do nível -1 para o +1 ocorreu um aumento na atividade de esterificação (AE). Quando se fixou a massa da enzima (ensaios 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6) observa-se que com o aumento do % de SI do nível -1 para o +1 também ocorreu aumento da atividade enzimática. Esses resultados indicam que as duas variáveis analisadas possuem um efeito positivo na imobilização. As maiores atividades de esterificação foram encontradas nos experimentos realizados nos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11), indicando uma otimização do processo.

O modelo foi validado pela análise de variância (APÊNDICE B), pois apresentou F_{calculado} (31,68) maior que o F_{tabelado} (5,05), com um coeficiente de determinação (R²) de 0,96. Os dados permitem dessa forma, a apresentação do modelo matemático (Equação 8) obtido pelos valores do coeficiente de regressão (APÊNDICE B) e a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 23.

Todos os fatores avaliados para a ativação foram estatisticamente significativos (p ≤ 0,05) no que se refere à atividade de esterificação dos suportes imobilizados. Houve um efeito linear positivo para massa de enzima e para o sólido iônico e um efeito quadrático negativo para a massa de enzima e sólido iônico. A interação entre as duas variáveis apresentou efeito positivo.

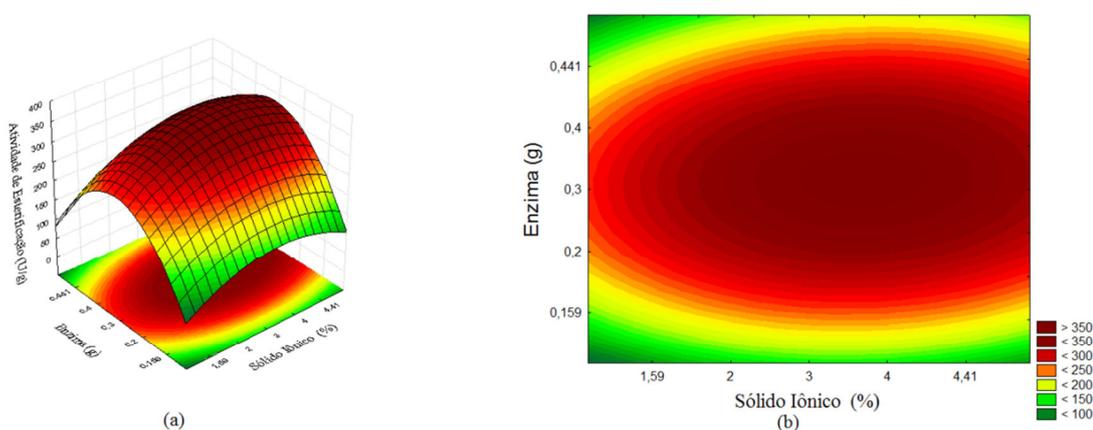
A Equação 8 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade de esterificação para a imobilização em MCM-48[C₁₄MI]Cl em função das variáveis massa de enzima e percentual de sólido iônico.

$$AE = 361,40 + 21,96x_1 - 32,01x_1^2 + 13,71x_2 - 96,05x_2^2 + 6,46x_1x_2 \quad (8)$$

O cálculo dos pontos ótimos da massa de enzima e concentração de sólido iônico para a obtenção da máxima atividade de esterificação foi realizado igualando-se a primeira derivada da atividade de esterificação da massa de enzima e do sólido iônico a zero.

As máximas atividades de esterificação a partir do modelo matemático foram obtidas nos níveis +0,351 para a concentração de sólido iônico e +0,083 para massa de enzima. O que corresponde a valores reais de 3,351 % de sólido iônico e 0,308 g de enzima, o que também pode ser visualizado pela superfície de resposta e curva de contorno (Figura 23).

Figura 23 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) da imobilização da CALB em MCM-48[C₁₄MI]Cl



Com base nos resultados obtidos, realizou-se uma nova imobilização com os pontos ótimos para confirmar as variáveis otimizadas. Esse derivado imobilizado foi utilizado para os testes posteriores.

5.5.3 Confirmação das condições experimentais ótimas descritas pelo modelo

A Tabela 11 apresenta os resultados dos experimentos realizados nas condições ótimas descritas pelo modelo matemático (3,351 % de SI e 0,308 g de enzima) para confirmação dos

níveis de massa de enzima e concentração de sólido iônico ótimo para obtenção de máxima atividade de esterificação.

Tabela 11 - Resultados do teste da condição ótima predita pelo modelo

Atividade experimental (U/g) $\pm \sigma$	Atividade predita (U/g)	Erro relativo (%)	Rendimento (%)
392,92 \pm 12,38	365,83	6,89	688

Observa-se que as atividades experimentais obtidas na imobilização, a partir das condições descritas pelo modelo, apresentaram valor superior ao predito. O rendimento da imobilização também foi calculado e corresponde a 688 %.

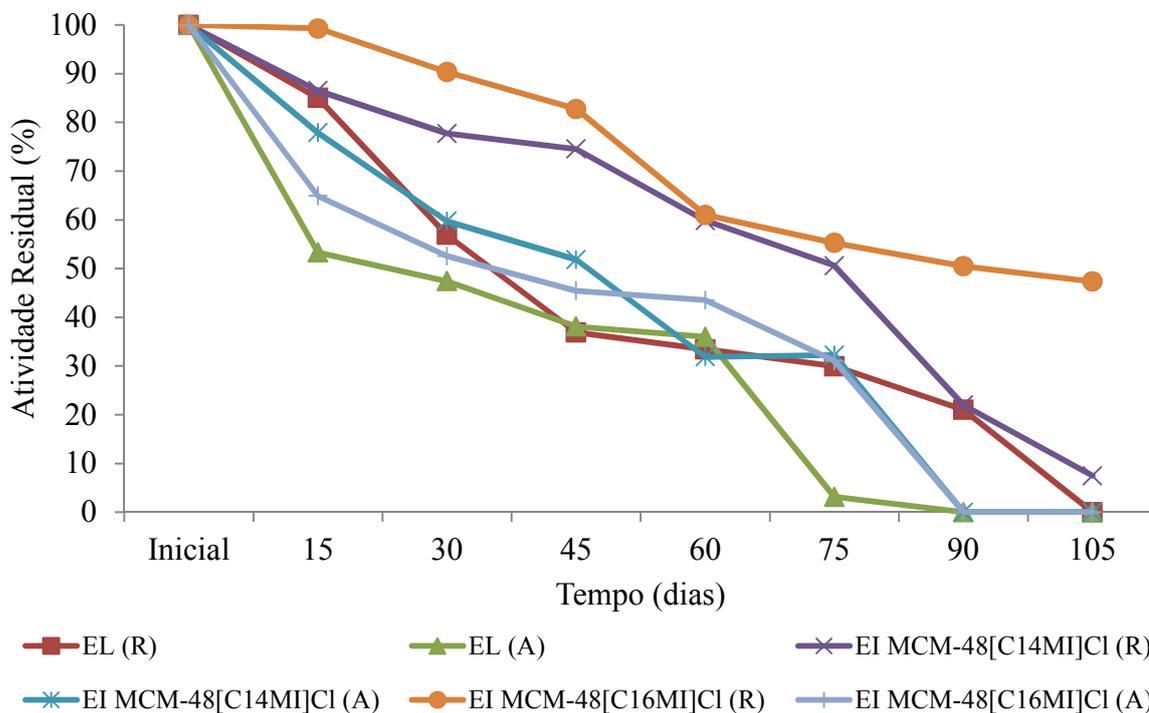
Conforme já discutido no item 5.4.3, os elevados resultados, tanto para atividade de esterificação quanto para o rendimento, demonstram que materiais do tipo MCM-48 apresentam desempenho satisfatório para imobilização enzimática. Da mesma forma, o sólido iônico cloreto de 1-tetradecil-3-metilimidazólio atuou no sentido de melhorar os valores de atividade de esterificação durante processo de imobilização.

Os valores experimentais de atividade de esterificação obtidos para este suporte estão ligeiramente abaixo dos valores encontrados para o suporte MCM-48[C₁₆MI]Cl. Tal comportamento pode ser atribuído ao tamanho da cadeia carbônica do sólido iônico utilizado na síntese do material. Souza et al. (2013) constataram em seus estudos que quanto maior a cadeia do líquido iônico, maior seu caráter hidrofóbico e melhor a eficiência na atividade enzimática, pois possibilita a formação de uma camada de hidratação ao redor da enzima favorecendo a atividade lipolítica, induzindo a água para mais próximo da enzima.

5.6 Estabilidade ao armazenamento

A Figura 24 descreve o comportamento das atividades de esterificação residual para as amostras imobilizadas nos dois suportes estudados, a partir dos pontos otimizados no DCCR, onde em todos os testes foram utilizadas amostras de enzima livre para comparação. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente (20-25 °C) e em refrigeração (3-5 °C).

Figura 24 - Estabilidade ao armazenamento da enzima livre e dos derivados imobilizados



EL: Enzima livre; EI: Enzima imobilizada; (R): armazenado em refrigeração; (A) armazenado em temperatura ambiente

A estabilidade ao armazenamento por longos períodos é um dos principais fatores a ser considerado quando se utiliza enzimas imobilizadas. Nesse contexto, a Figura 24 demonstra que, independente da temperatura de armazenamento, as enzimas imobilizadas, em ambos os suportes, apresentam atividades residuais superiores a enzima livre, durante o período avaliado.

Considerando a temperatura de armazenamento, todas as amostras apresentaram a mesma tendência, ou seja, as amostras armazenadas sob refrigeração apresentaram as maiores atividades residuais e maiores tempos de estabilidade.

Para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl armazenado sob refrigeração observa-se com 90 dias uma atividade residual de 50,98 %, a qual é 2,5 vezes superior a atividade residual observada para a enzima livre (21 %). Com 105 dias a diferença é ainda maior, pois a enzima livre encontrava-se desativada.

Tendência semelhante é observada para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl refrigerado. Até os 75 dias de armazenamento, a atividade foi mantida em 50,60

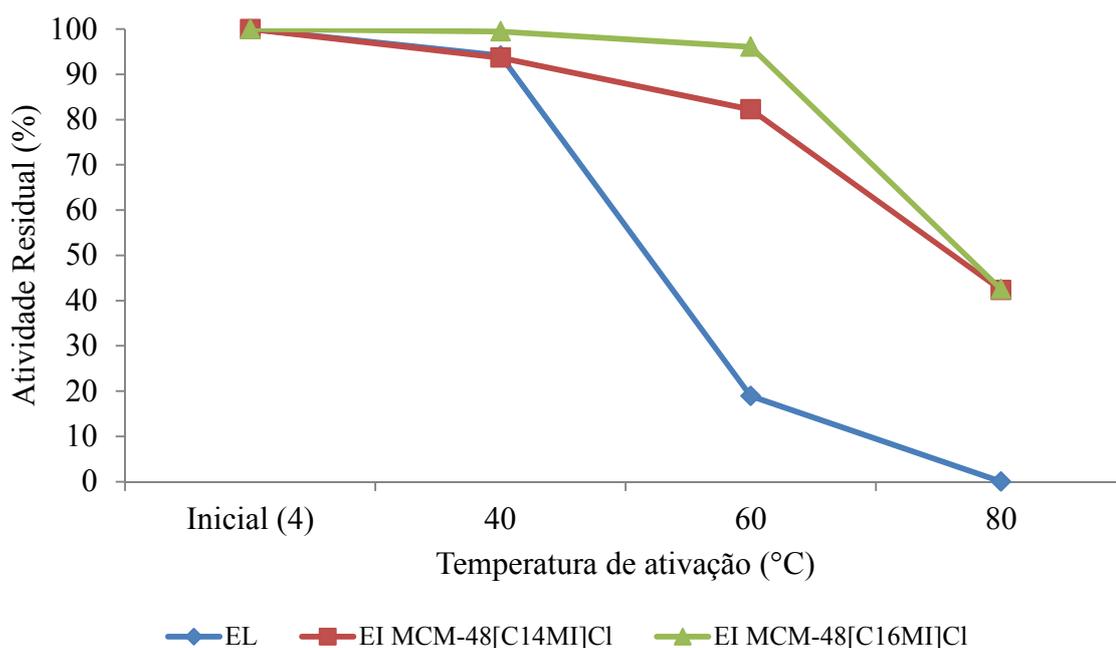
%, ou seja, aproximadamente 1,7 vezes superior à observada para a enzima livre no mesmo período (29,96 %).

5.7 Estabilidade térmica

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 25 apresenta as atividades residuais de esterificação referentes às estabilidades térmica da enzima livre (EL) e dos derivados imobilizados ativados nas temperaturas de 40, 60 e 80 °C por um período de 1 h.

Figura 25 - Estabilidade térmica da enzima livre e dos derivados imobilizados



EL: Enzima livre; EI: Enzima imobilizada

É possível observar na Figura 25 que para a enzima livre houve uma intensa redução na atividade residual com o aumento da temperatura de 40 para 60 e 80 °C. Em 60 e 80 °C, após 1 h de tratamento, a enzima livre perde 81 e 100 %, respectivamente, de sua atividade residual. Diferentemente da enzima livre, os derivados imobilizados, independente do suporte (MCM-48[C₁₆MI]Cl ou MCM-48[C₁₄MI]Cl), mesmo a 60 e 80 °C, mantêm mais de 80 e 40

% de suas atividades residuais, respectivamente, indicando assim um efeito positivo da imobilização em relação à estabilidade térmica da enzima.

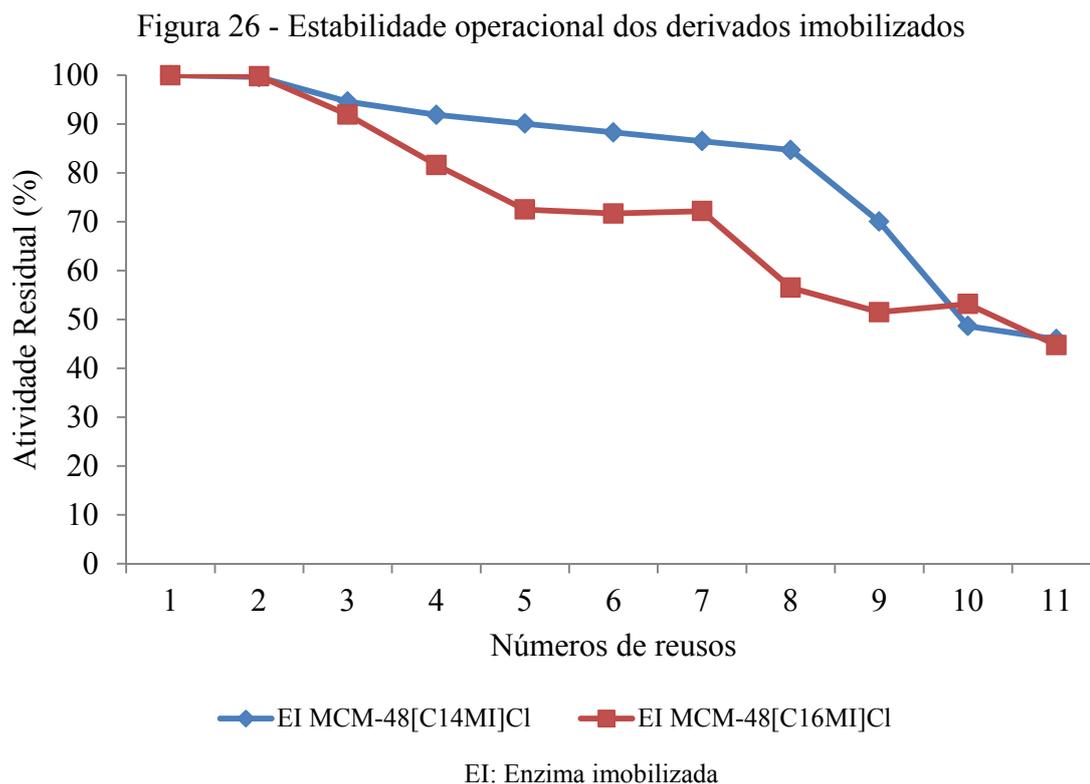
Os dados indicam que o procedimento de imobilização atuou no sentido de aumentar a estabilidade térmica da enzima nas amostras analisadas, o que é muito favorável, pois permite operações de trabalho em uma faixa maior de temperatura. Os resultados convergem com outros estudos que apontam que a estabilidade térmica da lipase imobilizada é maior do que a enzima livre e deve-se principalmente a ação do suporte em evitar a transição da conformação da enzima em altas temperaturas (KIM et al., 2006).

Resultados semelhantes foram encontrados por Ficanha et al. (2015), que analisaram a estabilidade térmica de CALB imobilizada em xerogéis. Souza (2013) relatou que a enzima CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas perde sua atividade em 20 % após 10 minutos a 60 °C. A enzima na forma livre, nas mesmas condições, perdeu mais de 70 % de sua atividade inicial. Simões et al. (2011) estudaram a estabilidade térmica de lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada em quitosana por ligação covalente, no tratamento a 50 °C a lipase na forma livre apresentou 20 % da atividade residual após 60 min de incubação, enquanto a lipase na forma imobilizada manteve 60 % da atividade inicial nesse mesmo período de tempo.

5.8 Estabilidade operacional

Um dos principais objetivos da imobilização é a reutilização das enzimas em mais de um ciclo de reação, proporcionando assim uma redução nos custos dos processos industriais, no que se refere ao catalisador, ou seja, as enzimas.

A possibilidade de reutilizar a lipase CALB imobilizada nos suportes estudados foi determinada empregando como modelo a reação de esterificação do oleato de etila em reuso contínuo. O comportamento das atividades residuais, tendo como referência a atividade da primeira reação, é apresentado na Figura 26.



Os resultados indicam a possibilidade da reutilização da enzima immobilizada no suporte MCM-48[C₁₆MI]Cl por até 10 vezes, considerando a atividade residual \geq a 50 % da atividade inicial. Já para a enzima immobilizada no suporte MCM-48[C₁₄MI]Cl os resultados demonstram que é possível a reutilização por até 9 ciclos. Os resultados apresentados são promissores quando comparados com a literatura, comprovando que a CALB immobilizada nos suportes estudados é atraente para potenciais aplicações industriais.

Diversos estudos vêm sendo publicados a fim de estudar os ciclos de reutilização de enzimas immobilizadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Ficanha et al. (2015), que ao estudarem a atividade residual de CALB immobilizada por encapsulação em xerogéis, obtiveram 9 ciclos de reuso com o suporte xerogel básico. Macario et al. (2007), estudaram a imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) em diferentes suportes zeolíticos por adsorção e obtiveram apenas 3 ciclos de reutilização. Lei et al. (2011), ao imobilizarem naringinase por adsorção em suporte MCM-41 conseguiram 6 ciclos de utilização. Jun et al. (2013), observaram que a imobilização da CALB em suportes de poliacrilato macroporosos seguida de biossilicificação com precursor tetrametilortosilicato (TMOS), manteve a atividade enzimática após 5 ciclos de reutilização. Bukhari et al. (2014), observaram 15 ciclos de reutilização com a CALB immobilizada em poliestireno.

5.9 Aplicação da CALB imobilizada em reações de produção de ésteres

5.9.1 Produção enzimática de ésteres a partir do geraniol

A fim de avaliar a aplicação CALB imobilizada foram realizados estudos para produção de ésteres a partir do geraniol utilizando os ácidos acético e butírico.

5.9.2.1 Síntese do acetato de geranila

Visando avaliar a influência das variáveis independentes na produção de acetato de geranila, um delineamento composto central (DCC) 2^3 foi realizado, com três repetições no ponto central. As variáveis independentes estudadas foram razão molar (álcool/ácido), concentração da enzima imobilizada (% (m/m), em relação ao substrato) e temperatura (°C).

A Tabela 12 apresenta a matriz do planejamento de experimentos com os valores reais e codificados das variáveis independentes, bem como as conversões em acetato de geranila utilizando a enzima imobilizada nos dois suportes estudados.

Tabela 12 - Matriz do DCC 2^3 (valores e codificados) com as respostas para a conversão do acetato de geranila

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	Conversão (%)	
				EI MCM-48 [C ₁₄ MI]Cl	EI MCM-48 [C ₁₆ MI]Cl
1	-1 (1:1)	-1 (7)	-1 (40)	10,0	19,8
2	1 (5:1)	-1 (7)	-1 (40)	22,7	17,8
3	-1 (1:1)	1 (13)	-1 (40)	15,9	26,9
4	1 (5:1)	1 (13)	-1 (40)	24,3	22,0
5	-1 (1:1)	-1 (7)	1 (60)	18,5	25,9
6	1 (5:1)	-1 (7)	1 (60)	26,3	20,1
7	-1 (1:1)	1 (13)	1 (60)	32,5	42,5
8	1 (5:1)	1 (13)	1 (60)	29,4	38,6
9	0 (3:1)	0 (10)	0 (50)	19,3	30,2
10	0 (3:1)	0 (10)	0 (50)	19,0	30,2
11	0 (3:1)	0 (10)	0 (50)	19,1	30,2

X₁: razão molar (álcool/ácido); X₂: concentração da enzima imobilizada (%); X₃: temperatura (°C)
EI: enzima imobilizada

A partir da Tabela 12 pode ser observado que a enzima imobilizada nos diferentes suportes apresentou comportamentos semelhantes em função dos níveis estudados, com as

maiores taxas de conversão apresentadas nos ensaios 7, onde a concentração da enzima e a temperatura estão em seus maiores níveis.

Analisando independentemente cada variável observa-se, para ambos os suportes, que o aumento da temperatura (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8), independentemente da razão molar e da concentração de enzima, proporcionou um aumento da conversão em acetato de geranila. Essa tendência pode ser justificada pela natureza endotérmica das reações de esterificação. Entalpias positivas (ΔH) foram observadas por diferentes autores para a síntese enzimática de ésteres, como o oleato de isoamila (LAGE et al., 2016), levulinato de hexila (BADGUJAR; BHANAGE, 2015) e na acilação do flavonóide rutina com ácido láurico (RAZAK; ANNUAR, 2015), empregando as lipases *Candida antarctica* B e *Thermomyces lanuginosus* imobilizadas em diferentes suportes. O caráter endotérmico das reações de esterificação indica que a mesma ocorre com absorção de calor e que o aumento da temperatura proporcionará no sistema reacional em equilíbrio um deslocamento para a formação dos produtos, aumentando assim seu rendimento. A temperatura também pode estar contribuindo com a transferência de massa, devido principalmente a diminuição da densidade e viscosidade do meio reacional. Segundo Shames (1999), o aumento da temperatura proporciona um aumento das distâncias intermoleculares, diminuindo assim as forças atrativas entre as moléculas e, conseqüentemente a viscosidade, a qual varia proporcionalmente com a força de atração entre as moléculas.

Quanto a variável razão molar, em alguns estudos é apresentado que o excesso de álcool interfere positivamente nos processos de conversão (CHIARADIA et al., 2012; AZUDIN; DON; SHUKOR, 2013), similar ao observado nesse estudo, quando essa variável é analisada de forma independente. A melhora nos resultados de conversão está relacionada à diminuição de acidez no meio e ao deslocamento de equilíbrio pelo excesso de álcool. Por ser uma reação reversível (esterificação), o excesso de álcool por si só pode afetar positivamente o processo de conversão, mediante o deslocamento do equilíbrio para os produtos, ou seja, para a produção do éster. Por outro lado, também há estudos que relatam que há um limite para adição de álcool, pois o excesso acima do nível crítico resulta em taxas mais baixas de conversão devido à formação de ligações entre o álcool e o sítio ativo da enzima (GUVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002).

Outra variável de extrema importância é a massa de catalisador utilizada. Para essa variável, analisada de forma independente (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8), observar-se um aumento da conversão do acetato de geranila com o acréscimo da concentração de enzima.

Esse aumento na conversão era esperado e está relacionada à ampliação do número de sítios ativos presentes no meio reacional proporcionado pelo aumento da concentração de enzima. Salum et al. (2008) também observaram que o aumento da massa de catalisador empregado na reação afeta diretamente, e de forma positiva, o processo de conversão em reações de esterificação.

Considerando as condições do ponto central, observa-se um melhor desempenho na produção de acetato de geranila, com conversão de 30 %, para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl. Nos mesmos ensaios, para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl a conversão foi de 17 %. Os resultados apresentados nesse estudo seguem a mesma tendência dos resultados obtidos para a atividade de esterificação a partir das condições ótimas descritas pelos modelos matemáticos, quando foram otimizadas as condições dos suportes estudados (itens 5.4.3 e 5.5.3). Assim, novamente é possível relacionar os melhores resultados apresentados para a enzima imobilizada no suporte MCM-48[C₁₆MI]Cl com o maior tamanho da cadeia carbônica do sólido iônico, a qual aumenta seu caráter hidrofóbico e melhora a eficiência da atividade enzimática, possibilitando a formação de uma camada de hidratação ao redor da enzima e conseqüentemente favorecendo a atividade lipolítica, induzindo a água para mais próximo da enzima.

A partir dos resultados obtidos nas análises de variância (APÊNDICE C), é possível observar a validação de ambos os planejamentos, pois apresentaram valores de $F_{\text{calculado}}$ (8,47 para enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl e 13,18 para a enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl) maiores que o F_{tabelado} (6,16), com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,93.

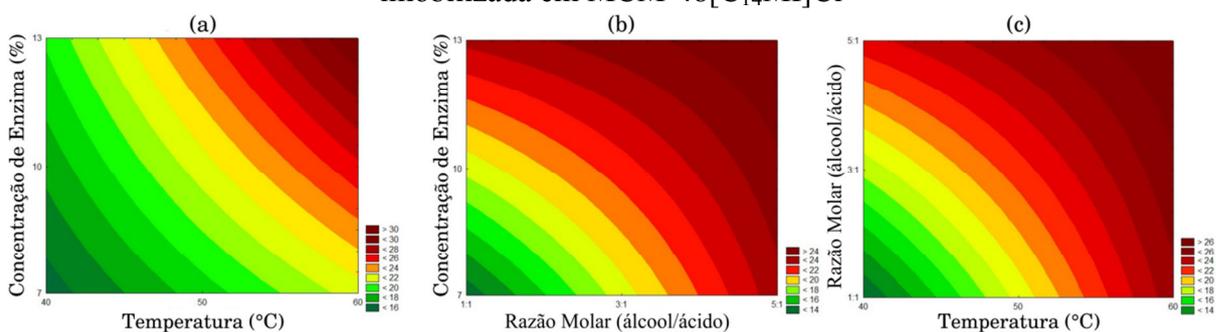
Todos os fatores avaliados foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) no que se refere à conversão do acetato de geranila. Analisando os coeficientes de regressão (APÊNDICE D) para a amostra onde a enzima foi imobilizada no suporte MCM-48[C₁₄MI]Cl observa-se um efeito positivo para todas as variáveis. Quanto à interação entre as variáveis, apresenta-se efeito negativo para a razão molar x concentração de enzima e para a razão molar x temperatura. Já para interação entre concentração de enzima x temperatura o efeito é positivo.

De acordo com os coeficientes de regressão (APÊNDICE D) para a amostra onde a enzima foi imobilizada no suporte MCM-48[C₁₆MI]Cl verifica-se um efeito positivo para as variáveis concentração da enzima imobilizada e temperatura e negativo para a razão molar. A interação entre as variáveis apresentou a mesma tendência da enzima imobilizada no suporte

MCM-48[C₁₄MI]Cl, com efeito positivo apenas para interação entre concentração de enzima x temperatura.

Os dados obtidos permitem a construção das curvas de contorno (Figuras 27 e 28) referente à interação das variáveis para a enzima imobilizada nos dois suportes estudados, possibilitando assim a análise da tendência das condições mais adequadas e que maximizam a resposta.

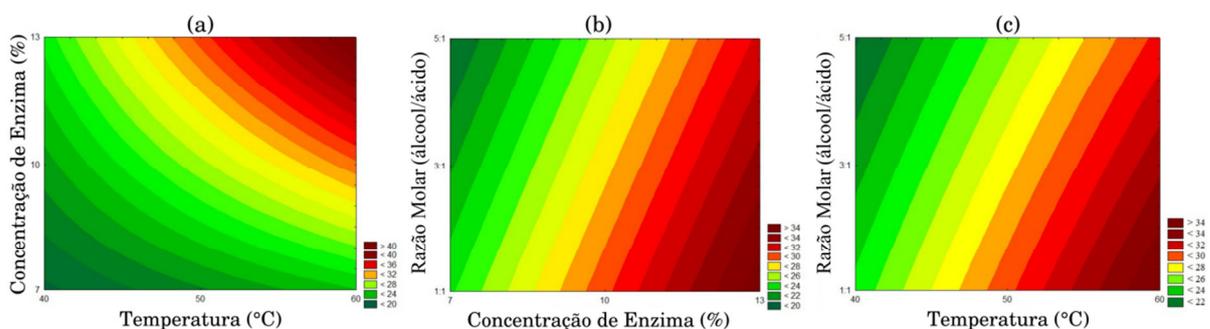
Figura 27 - Curva de contorno para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl



(a) Taxas de conversão do acetato de geranila em função da concentração de enzima (%) e temperatura (°C); (b) razão molar (álcool/ácido) e concentração de enzima (%); (c) razão molar (álcool/ácido) e temperatura (°C)

Analisando a Figura 27 (a), que representa o efeito da interação entre as variáveis concentração de enzima x temperatura, um acréscimo nos valores de ambas as variáveis conduzem a valores mais elevados da conversão do acetato de geranila. O mesmo ocorre nas Figuras 27 (b) e 27 (c), que indicam o efeito das variáveis concentração de enzima x razão molar e razão molar x temperatura, respectivamente.

Figura 28 - Curva de contorno para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl



(a) Taxas de conversão do acetato de geranila em função da concentração de enzima (%) e temperatura (°C); (b) razão molar (álcool/ácido) e concentração de enzima (%); (c) razão molar (álcool/ácido) e temperatura (°C)

Analisando a Figura 28 (a), que representa o efeito da interação entre as variáveis concentração de enzima x temperatura, um acréscimo nos valores de ambas as variáveis conduzem a valores mais elevados da conversão do acetato de geranila. Para as Figuras 28 (b) e 28 (c), que indicam o efeito das variáveis concentração de enzima x razão molar e razão molar x temperatura, respectivamente, percebe-se que as maiores taxas de conversão são apresentadas nos níveis mais elevados de concentração de enzima e temperatura, porém no nível mais baixo de razão molar.

Alguns estudos apresentados na literatura referentes à produção do éster acetato de geranila serão expostos a seguir: Badgujar e Bhanage (2014) ao utilizarem a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em polímero obtiveram 99 % de conversão após 3 h de reação a 55 °C, no estudo foi utilizada alta carga de catalisador. Dhakate et al. (2013) sintetizaram acetato de geranila catalisado por lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em membranas de nanofibras, por adsorção e ligação covalente, e obtiveram taxas de conversão de 90 e 66 %, respectivamente. Lipase de *Candida rugosa* imobilizada em nanopartículas de óxido de zinco foi utilizada como catalisador na reação de síntese do acetato de geranila por Patel et al. (2016), os quais obtiveram 94 % de conversão após 6 h de reação. Embora os resultados apresentados para a conversão do acetato de geranila estejam inferiores aos relatados na literatura, os mesmos são significativos e promissores, pois até o momento não há trabalhos publicados que relatam o emprego de lipase imobilizada em suportes semelhantes aos estudados. No entanto, percebe-se, que diferentes taxas de conversão na síntese do éster estão relacionadas principalmente com as características da enzima, suporte empregado e técnica de imobilização, além disso, os parâmetros empregados no processo também exercem grande influência, sendo eles, temperatura, razão molar dos reagentes, concentração de enzima e tempo de reação.

5.9.2.2 Síntese do butirato de geranila

Para a produção do butirato de geranila também foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2^3 , com três repetições no ponto central, para analisar a influência das variáveis independentes estudadas, sendo elas: razão molar (álcool/ácido), concentração da enzima imobilizada (% (m/m), em relação ao substrato) e temperatura (°C). A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis

independentes, bem como as conversões do butirato de geranila utilizando a enzima imobilizada nos dois suportes estudados.

Tabela 13 - Matriz do DCC 2³ (valores e codificados) com as respostas da conversão do butirato de geranila

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	Conversão (%)	
				EI MCM-48 [C ₁₄ MI]Cl	EI MCM-48 [C ₁₆ MI]Cl
1	-1 (1:1)	-1 (7)	-1 (40)	5,9	9,2
2	1 (5:1)	-1 (7)	-1 (40)	10,5	9,5
3	-1 (1:1)	1 (13)	-1 (40)	13,5	12,0
4	1 (5:1)	1 (13)	-1 (40)	18,7	19,6
5	-1 (1:1)	-1 (7)	1 (60)	9,4	12,0
6	1 (5:1)	-1 (7)	1 (60)	17,9	15,4
7	-1 (1:1)	1 (13)	1 (60)	12,4	13,8
8	1 (5:1)	1 (13)	1 (60)	18,0	22,9
9	0 (3:1)	0 (10)	0 (50)	13,2	17,5
10	0 (3:1)	0 (10)	0 (50)	13,2	17,1
11	0 (3:1)	0 (10)	0 (50)	12,9	17,1

X₁: razão molar (álcool/ácido); X₂: concentração da enzima imobilizada (%); X₃: temperatura (°C)
EI: enzima imobilizada

A partir da Tabela 13 é possível observar que em ambos os suportes as maiores taxas de conversão foram apresentadas nos ensaios 4 (18,7 % para a EI MCM-48[C₁₄MI]Cl e 19,6 % para a EI MCM-48[C₁₆MI]Cl) e 8 (18,0 % para a EI MCM-48[C₁₄MI]Cl e 22,9 % para a EI MCM-48[C₁₆MI]Cl), onde a concentração da enzima está em seus maiores níveis.

Analisando cada variável de forma independente, observa-se para a razão molar um comportamento semelhante para ambos os derivados imobilizados (ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8), apresentando um aumento na conversão com o aumento da razão molar (álcool/ácido). Este comportamento é semelhante ao observado na síntese do acetato de geranila e foi vinculado ao efeito positivo do excesso de álcool, o qual atua diminuindo a acidez do meio e deslocando o equilíbrio no sentido dos produtos.

Em relação à concentração da enzima para ambos os derivados imobilizados, assim como ocorreu para a síntese do acetato de geranila, verifica-se um aumento na conversão do éster com o acréscimo dos valores dessa variável (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8). Esta tendência está associada ao aumento de sítios ativos, proporcionado pelo aumento da concentração da enzima.

A variável temperatura, analisada de maneira independente, apresentou um comportamento distinto entre os derivados imobilizados. Enquanto que para a enzima

imobilizada no suporte MCM-48[C₁₆MI]Cl a temperatura apresentou um efeito positivo para todas as condições analisadas (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8), para a enzima imobilizada no suporte MCM-48[C₁₄MI]Cl a temperatura somente proporcionou um efeito positivo para as menores concentrações de enzima, ou seja, para as amostras com 7 % (ensaios 1 e 5, 2 e 6), independente da razão molar. Para a concentração de enzima equivalente a 13 % praticamente não houve efeito da temperatura.

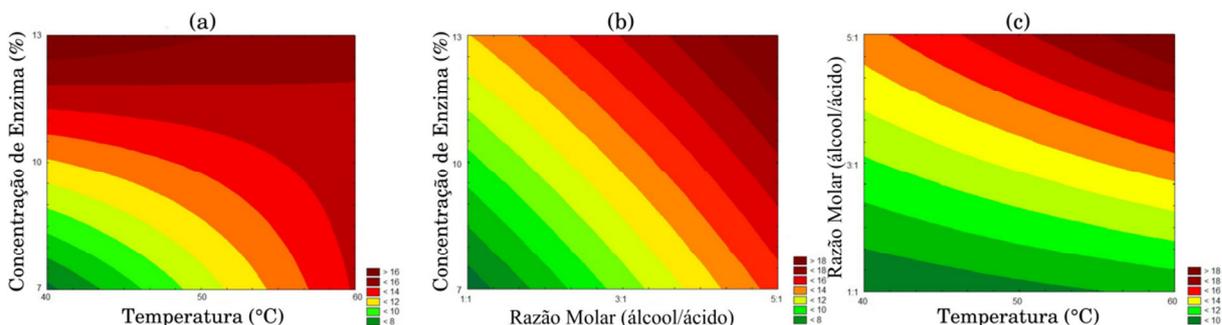
Considerando as condições do ponto central, observa-se um melhor desempenho na produção de butirato de geranila, com conversão de 17 % para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₆MI]Cl. Nos mesmos ensaios, para o derivado imobilizado enzima/MCM-48[C₁₄MI]Cl a conversão foi de 13 %. Essa tendência também foi observada na síntese do acetato de geranila e nas atividades de esterificação quando foram otimizadas as condições dos suportes estudados. Esse comportamento é atribuído ao aumento do tamanho da cadeia carbônica do sólido iônico.

A partir dos resultados obtidos na análise de variância (APÊNDICE E), é possível a validação de ambos os planejamentos, pois apresentaram valores de $F_{\text{calculado}}$ (57,57 para enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl e 6,75 para a enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl) maiores que o F_{tabelado} (6,16). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,99 e 0,91, respectivamente.

Todos os fatores avaliados foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) e positivos no que se refere à conversão do butirato de geranila. Analisando a interação entre as variáveis observa-se para a enzima imobilizada no suporte MCM-48[C₁₄MI] um efeito positivo para a razão molar x temperatura. Já para as interações razão molar x concentração da enzima e concentração da enzima x temperatura o efeito é negativo. Para a enzima imobilizada no suporte MCM-48[C₁₆MI]Cl as interações entre as variáveis apresentaram um efeito negativo apenas para a razão molar x temperatura (APÊNDICE F).

Os dados permitem dessa forma, a construção das curvas de contorno apresentadas nas Figuras 29 e 30 referente à interação das variáveis para a enzima imobilizada nos dois suportes estudados, possibilitando assim a análise da tendência das condições mais adequadas que maximizam a resposta.

Figura 29 - Curva de contorno para a conversão do butirato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl

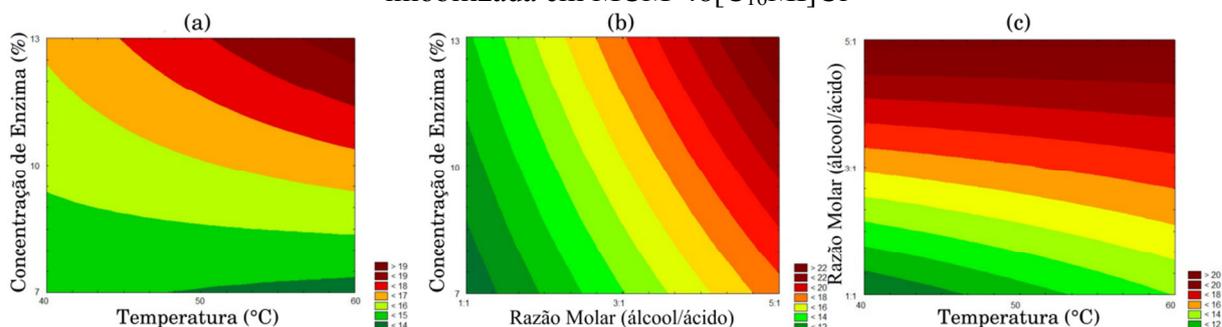


(a) Taxas de conversão do butirato de geranila em função da concentração de enzima (%) e temperatura (°C); (b) razão molar (álcool/ácido) e concentração de enzima (%); (c) razão molar (álcool/ácido) e temperatura (°C)

Analisando a Figura 29 (a), que representa o efeito da interação entre as variáveis concentração de enzima x temperatura, percebe-se que as maiores taxas de conversão são apresentadas nos níveis mais elevados de concentração de enzima. Para a temperatura o efeito sobre a conversão (%) é mais pronunciado nas menores concentrações da enzima. Com o aumento da concentração de enzima o efeito da temperatura se torna menor, apresentando para o extremo superior, com 13 %, em uma região onde praticamente não vemos efeito da temperatura sobre o rendimento.

Para as Figuras 29 (b) e 29 (c), que indicam o efeito das variáveis concentração de enzima x razão molar e razão molar x temperatura, respectivamente, um acréscimo nos valores de ambas as variáveis conduzem a valores mais elevados da conversão do butirato de geranila.

Figura 30 - Curva de contorno para a conversão do butirato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl



(a) Taxas de conversão do butirato de geranila em função da concentração de enzima (%) e temperatura (°C); (b) razão molar (álcool/ácido) e concentração de enzima (%); (c) razão molar (álcool/ácido) e temperatura (°C)

Analisando as Figuras 30 (a) e 30 (b), que representam o efeito da interação entre as variáveis concentração de enzima x temperatura e concentração da enzima x razão molar, respectivamente, percebe-se que as maiores taxas de conversão são apresentadas nos níveis mais elevados de todas as variáveis. Para a Figura 30 (c), que indica o efeito das variáveis razão molar x temperatura, um acréscimo nos valores da razão molar em todas as faixas de temperatura estudadas apresentam as melhores taxas de conversão.

Ao nosso conhecimento, até o momento, não há trabalhos publicados na literatura que relatam a síntese do butirato de geranila empregando a lipase imobilizada em suportes mesoporosos para comparação, porém, serão apresentados alguns trabalhos também utilizando lipases para síntese do referido éster. Damjanovic e colaboradores (2012) ao aplicarem a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em polímeros comerciais obtiveram 99 % de conversão para o butirato de geranila após 48 h de reação em processo descontínuo e 78,9 % de conversão após 10 h de reação em reator de leito fluidizado. Karra-Chaabouni e colaboradores (2002) analisaram a influência da atividade de água na conversão do butirato de geranila catalisada pela lipase *Mucor miehei* e obtiveram 75 % de rendimento após 75 h de reação. Para a síntese desse éster as variáveis como massa do catalisador, temperatura e razão molar também irão influenciar nos resultados obtidos. Os valores de conversão obtidos nesse estudo são importantes e promissores para a síntese do butirato de geranila.

Em relação ao efeito do número de carbonos das cadeias dos ácidos (ácido acético - $C_2H_4O_2$ e ácido butírico - $C_4H_8O_2$) na formação dos ésteres estudados, observa-se que as maiores conversões foram alcançadas para o ácido de cadeia mais curta (ácido acético), independente do derivado imobilizado empregado. Este comportamento pode ser atribuído à estrutura do sítio ligante da CALB, que possui forma elíptica afunilada, com uma estreita fenda. Assim, à medida que aumenta o número de carbonos do agente acilante (de 2 para 4), começa a haver um certo impedimento estérico, resultando em baixa eficiência da reação enzimática (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). Tendência semelhante foi observada por Viskupicova e colaboradores (2010), que avaliaram a influência da cadeia de ácidos graxos na formação de ésteres de rutina e obtiveram uma diminuição gradual nas taxas de conversão conforme aumento da cadeia carbônica dos ácidos estudados.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho estudou-se o processo de imobilização da lipase *Candida antarctica* B em suporte mesoporoso do tipo MCM-48 sintetizado com dois sólidos iônicos, cloreto de 1-hexadecil-3metilimidazólio ($[C_{16}MI]Cl$) e cloreto de 1-tetradecil-3metilimidazólio ($[C_{14}MI]Cl$).

Os suportes apresentaram características condizentes com os materiais mesoporosos de interesse e o alongamento da cadeia carbônica do sólido iônico utilizado na síntese do material MCM-48 influenciou diretamente no aumento da área específica e volume de poro do material.

Para o derivado imobilizado enzima/MCM-48 $[C_{16}MI]Cl$ a partir da análise estatística, foi possível obter os níveis ideais para alcançar as melhores atividades de esterificação da enzima, com otimização de modelo matemático. As variáveis otimizadas foram de 0,20 g de enzima e 1,90 % de sólido iônico que apresentaram máxima atividade de esterificação de 469,61 U/g e rendimento de 822 %. Para o derivado imobilizado enzima/MCM-48 $[C_{14}MI]Cl$, também foi possível obter os níveis ideais para as melhores atividades de esterificação da enzima, com otimização de modelo matemático, sendo que as variáveis otimizadas foram de 0,31 g de enzima e 3,35 % de sólido iônico que apresentaram máxima atividade de esterificação de 392,92 U/g e 688 % de rendimento.

A imobilização atuou de maneira positiva na estabilidade ao armazenamento, pois os derivados imobilizados enzima/MCM-48 $[C_{16}MI]Cl$ e enzima/MCM-48 $[C_{14}MI]Cl$ apresentaram atividade residual acima de 50 % quando estocados sob refrigeração, por 90 e 75 dias, respectivamente, sendo que nas mesmas condições a enzima livre foi desativada consideravelmente.

O processo de imobilização também proporcionou um aumento na estabilidade térmica em relação à enzima livre. Em 60 e 80 °C a enzima imobilizada no suporte MCM-48 $[C_{16}MI]Cl$ reteve 96 e 44 %, respectivamente, de sua atividade inicial. Também nessas temperaturas a enzima imobilizada em MCM-48 $[C_{14}MI]Cl$ reteve 82 e 42 %, respectivamente.

O estudo da estabilidade operacional de reuso da enzima imobilizada mostrou que ela pode ser reutilizada por até 10 ciclos quando imobilizada em MCM-48 $[C_{16}MI]Cl$ e por até 9 ciclos quando imobilizada em MCM-48 $[C_{14}MI]Cl$.

Resultados significativos foram obtidos com a utilização dos biocatalisadores desenvolvidos para obtenção do acetato e butirato de geranila, sendo que a concentração da enzima, a temperatura e a razão molar dos substratos mostraram-se parâmetros importantes e que afetam o rendimento das reações.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a imobilização pela técnica *in situ* apresentou-se eficaz, possibilitando o aprisionamento da enzima no interior da rede cristalina do material e conseqüentemente dificultando sua lixiviação para o meio. Além disso, o material mesoporoso do tipo MCM-48 é eficiente e promissor para imobilização da CALB devido sua grande área superficial, estabilidade térmica e fácil recuperação do meio reacional. Ademais, deve-se ressaltar o custo-benefício do suporte, pela facilidade de síntese, uma vez que não demanda altas temperaturas como a maioria dos suportes inorgânicos, tornando-se potencial para o uso em aplicações industriais.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir das constatações durante o desenvolvimento desse trabalho, é possível sugerir os seguintes estudos futuros nesta área:

- a) Avaliar a imobilização *in situ* da enzima *Candida antarctica* B em outros materiais mesoporosos, como por exemplo, em MCM-41;
- b) Testar outras variações da cadeia carbônica dos sólidos iônicos a partir do ânion cloreto e do cátion imidazólio no suporte MCM-48;
- c) Aprimorar os estudos para melhorar o rendimento na aplicação dos derivados imobilizados na síntese de ésteres a partir do geraniol, bem como avaliar a estabilidade operacional de reuso para essas aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W. S. et al. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated hitosan. **Brazilian Journal of Chemical**, v. 22, n. 4, p. 529-538, 2005.

ALDRICH, Ionic Liquids – Enabling Technologies, **ChemFiles**, v. 5, n. 6, 2005.

ANDERSON, J. L.; ARMSTRONG, D. W.; WEI, G. T. Room-temperature ionic liquids have tremendous potential in organic synthesis, green chemistry, separations, MS, spectroscopy, and electrochemistry. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 2892-2902, 2006.

AZUDIN, N. Y.; DON, M. 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.

BACHA, A. B. et al. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 309-317, 2005.

BADGUJAR, C. K.; BHANAGE, B. M. Synthesis of geranyl acetate in non-aqueous media using immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase on biodegradable polymer film: Kinetic modelling and chain length effect study. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1304-1313, 2014.

BADGUJAR, C. K.; BHANAGE, B. M. Thermo-chemical energy assessment for production of energy-rich fuel additive compounds by using levulinic acid and immobilized lipase. **Fuel Processing Technology**, v. 138, p. 139-146, 2015.

BAERLOCHER, C. H.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. **Atlas of Zeolite Framework Types**, 6 ed. Elsevier: Amsterdam, 156 p, 2007.

BECK, J. S. et al. A New family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10834-10843, 1992.

BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 7, p. 546-552, 1992.

BOON, J. A. et al. Friedel Crafts reactions in ambient-temperature molten-salts. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, p. 480-483, 1986.

BORZANI, W. et al. **Biotechnologia Industrial**, v. I, Blucher: São Paulo, 254 p, 2001.

BRECK, D. W. et al. Crystalline zeolites. I. The properties of a new synthetic zeolite, Type A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p. 5963-5972, 1956.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.

- BUKHARI, A. et al. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, p. 1555-1564, 2014.
- BUZZEO, M. C.; EVANS, R. G.; COMPTON, R. G. Non-haloaluminate room-temperature ionic liquids in electrochemistry - A review. **A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, v. 5, p. 1106-1120, 2004.
- CAI, C.; WANG, H.; HAN, J. Synthesis and characterization of ionic liquid-functionalized alumino-silicate MCM-41 hybrid mesoporous materials. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 9802- 9808, 2011.
- CALGAROTO, C. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase in zeolite MCM 22 with diferente Si/Al ratios. **Applied Catalysis A: General**, v. 394, p. 101-104, 2011.
- CARVALHO, N. B. et al. Biochemical properties of *Bacillus* sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol-gel process. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 52-58, 2013.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- 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 de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 224-228, 1997.
- CHAUVIN, Y.; EINLOFT, S.; OLIVER, H. Catalytic dimerization of propene by nickel-phosphine complexes in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride/ $\text{AlEt}_x\text{Cl}_{3-x}$, ($x=0,1$) ionic liquids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 34, p. 1149-1155, 1995.
- 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.
- CLAON, P. A.; AKOH, C. C. Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in n-hexane. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 1211-1216, 1993.
- CLIFTON, R. A. **Natural and synthetic zeolites**. U.S.: Bureau of Mines, 21 p, 1987.
- COMIN, E. **Emprego de zeólitas contendo líquidos iônicos para a fixação química de CO_2 em carbonatos cíclicos**. 2010. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre.
- COOPER, E. R. et al. Ionic liquids and eutectic mixtures as solvent and template in synthesis of zeolite analogues. **Nature**, v. 430, p. 1012-1016, 2004.
- CORIOLOANO, A. C. F. et al. Aplicações ambientais de zeólitas na indústria de petróleo. **Revista eletrônica de petróleo e gás**, v. 3, n. 2, p. 9-18, 2015.

CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: History and development from the earliest days to the present time. **Chemical Reviews**, v. 103, p. 663-701, 2003.

CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: Precursors, intermediates and reaction mechanism. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 82, p. 1-78, 2005.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIM, M. A. Biodiesel: Visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

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.

DAMNJANOVIC, J. J. et al. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 50-59, 2012.

DA'NA, E.; SAYARI, A. Adsorption of heavy metals on amine-functionalized SBA-15 prepared by co-condensation: Applications to real water samples. **Desalination**, v. 285, p. 62-67, 2012.

DHAKATE, A. G. et al. Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. **Process Biochemistry**, v.48, p. 124-132, 2013.

DUMITRIU, E. et al. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 119-133, 2003.

DUPONT, J.; CONSORTI, C. S.; SPENCER, J. Room temperature molten salts: Neoteric "green" solvents for chemical reactions and processes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 337-344, 2000.

DZYUBA, S. V.; BARTSCH, R. A. Influence of structural variations in 1-alkyl(aralkyl)-3-methylimidazolium hexafluorophosphates and bis(trifluoromethylsulfonyl)imides on physical properties of the ionic liquids. **A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, v. 3, p. 161-166, 2002.

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

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

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.

FERRER, M. et al. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 75, p. 569-576, 2000.

FICANHA, A. M. M. et al. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v.38, n. 3, p. 364-369, 2015.

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

FRANZOI, A. C. et al. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1042-1050, 2011.

FREUDENMANN, D. et al. Ionic liquids: New perspectives for inorganic synthesis? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 11050-11060, 2011.

FRY, S. E.; PIENTA, N. J. Effects of molten salts on reactions nucleophilic aromatic substitution by halide ions in molten dodecyltributylphosphonium salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 6399-6400, 1985.

GABRIEL, S.; WEINER, J. Ueber einige Abkömmlinge des Propylamins. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 21, n. 2, p. 2669-2679, 1888.

GARCÍA-SAIZ, A. et al. Anion- π and halide-halide nonbonding interactions in a new ionic liquid based on imidazolium cation with three-dimensional magnetic ordering in the solid state. **Inorganic Chemistry**, v. 53, p. 8384-8396, 2014.

GHILANE, J. et al. Modification of carbon electrode in ionic liquid through the reduction of phenyl diazonium salt. Electrochemical evidence in ionic liquid. **Electrochemistry Communications**, v. 10, p. 1060-1063, 2008.

GHOBARKAR, H.; SCHAF, O.; GUTH, U. Zeolites- from kitchen to space. **Progress in Solid State Chemistry**, v.27, p. 29-73, 1999.

GIANNETTO, G. **Zeolitas: Características, propiedades y aplicaciones industriales**, 1 ed. Editorial Innovación Tecnológica: Caracas, 1990.

GLASER, R. Novel process options for the application of zeolites in supercritical fluids and ionic liquids. **Chemical Engineering Technology**, v. 30, n. 5, p. 557-568, 2007.

GONÇALVES, A. P. V. et al. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 93-101, 1997.

GONÇALVES, A. P. V. et al. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 1, p. 53-60, 1996.

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

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

HOFFMANN, F. et al. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 3216-3251, 2006.

HOLBREY, J. D.; SEDDON, K. R. The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 13, p. 2133-2139, 1999.

HSIEH, Y. N. et al. Nafion membrane-supported ionic liquid–solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAHs in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, p. 321-328, 2006.

HUDSON, S. et al. Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 19496-19506, 2005.

HURLEY, F. H.; WIER, T. P. Electrodeposition of aluminum from nonaqueous solutions at room temperature. **Journal of electrochemistry Society**, v. 98, p. 203, 1951.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 550-563, 2011.

IUPAC RECOMMENDATIONS. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.

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

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.

JUN, C. et al. Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1181-1187, 2013.

KARRA-CHAABOUNI, M. et al. Role of water activity on the synthesis of geranyl butyrate by a *Mucor miehei* esterase in a solvent-free system. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1951-1955, 2002.

KIM, H. J.; YOUN, S. H.; SHIN, C. S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 174-184, 2006.

KIM, J. M.; KIM, S. K.; RYOO, R. Synthesis of MCM-48 single crystals. **Chemical Communications**, n. 2, p. 259-260, 1998.

KIM, M. et al. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 62-68, 2006.

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

KLINGSHIRN, M. A. et al. Ionic liquids as solvent and solvent additives for the synthesis of sol-gel materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, p. 5174-5180, 2005.

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

LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.

LEE, S. G. Functionalized imidazolium salts for task-specific ionic liquids and their applications. **Chemistry Communications**, v. 10, p. 1049-1063, 2006.

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

LEÓN, G. C. et al. Synthesis of amino-functionalized MCM-48 silica via direct co-condensation at room temperature. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 204, p. 156-162, 2015.

LOPES, C. W. et al. TiO₂-TON zeolite synthesis using an ionic liquid as a structure-directing agent. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 213, p. 78-94, 2015.

LUNA, F. J.; SCHUCHARDT, U. Modificação de zeólitas para uso em catalise. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 885-892, 2001.

LUZ, A. B. **Zeólitas: propriedades e usos industriais**. Rio de Janeiro: CETEM-CNPq, 37 p. 1994.

MA, H. et al. Immobilization of lipase in a mesoporous reactor based on MCM-41. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 209-217, 2004.

- MA, Z.; YU, J.; DAI, S. Preparation of inorganic materials using ionic liquids. **Advanced Materials**, v. 22, p. 261-285, 2010.
- MACARIO, A. et al. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 328-335, 2007.
- MACARIO, A. et al. Hydrolysis of alkyl ester on lipase/silicalite-1 catalyst. **Catalysis Letters**, v. 122, p. 43-52, 2008.
- MACEDO, J. L. **Preparação e caracterização de materiais com base zeolítica para aplicação em catálise**. 2007. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Federal de Brasília - UNB, Brasília.
- MANGRULKAR, P. A. et al. Tyrosinase-immobilized MCM-41 for the detection of phenol. **Water Air & Soil Pollution**, v. 223, p. 819-825, 2012.
- MARIA, P. D. et al. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1, p. 36-46, 2005.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1541-1463, 2007.
- MATSUI, M. et al. Selective adsorption of biopolymers on zeolites. **Chemistry - A European Journal**, v. 7, p. 1555-1560, 2001.
- MCCUSKER, L. B.; LIEBAU, F.; ENGELHARDT, G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 381-394, 2001.
- MESSING, R. A. **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**, New York: Academic Press, p.63, 1975.
- MIGNONI, M. L. **Zeólitas obtidas com líquidos iônicos como direcionadores de estrutura: síntese e reatividade**. 2012. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre.
- MIGNONI, M. L. et al. Nickel oligomerization catalysts heterogenized on zeolites obtained using ionic liquids as templates. **Applied Catalysis A: General**, v. 374, p. 26-30, 2010.
- MOLINARI, F.; MARIANELLI, G.; ARAGOZZINO, F. Production of flavour esters by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 967-973, 1995.
- MONIRUZZAMAN, M. et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 295-314, 2010.

MORENO, N.; QUERO, X.; AYORA, C. Utilization of zeolites synthesized from coal fly ash for the purification of acid mine waters. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 3526-3534, 2001.

MORET, M. E. et al. Synthesis and characterization of organometallic ionic liquids and a heterometallic carbene complex containing the chromium tricarbonyl fragment. **Organometallics**, v. 24, p. 4039-4048, 2005.

MORRIS, R. E. et al. Ionic liquid assisted synthesis of zeolite-TON. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 640, p. 1177-1181, 2014.

MULLER, A. **Emprego de MCM-41 contendo líquidos iônicos na fixação química de CO₂ em carbonatos cíclicos**. 2013. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre.

MUSSATTO, S.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Revista Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

NAIK, B.; GHOSH, N. N. A Review on chemical methodologies for preparation of mesoporous silica and alumina based materials. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 3, p. 213-224, 2009.

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

OLIVEIRA, T. G. et al. Adsorção de CO₂ em peneiras moleculares micro e mesoporosas. **Química Nova**, v. 37, p. 610-617, 2014.

OTT, L. S.; FINKE, R. G. Transition-metal nanocluster stabilization for catalysis. **Chemical Reviews**, v. 251, p. 1075-1100, 2007.

PALMER, T. **Understanding enzymes**. 4 ed. Oxford: Prentice Hall. 1995.

PALOMO, J. M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 279-286, 2002.

PARK, M. et al. Hydrophobic mesoporous materials for immobilization of enzymes. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 124, p. 76-83, 2009.

PARNHAM, E. R.; MORRIS, R. E. Ionothermal synthesis of zeolites, metal-organic frameworks, and inorganic-organic hybrids. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, p. 1005-1013, 2007.

PAROUL, N. et al. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 85, p. 1636-1641, 2010.

PARSHALL, G. W. Catalysis in molten salt media. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, p. 8716-8719, 1972.

PÂRVULESCU, V. I.; HARDACRE, C. Catalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2615-2665, 2007.

PATEL, V. et al. Zinc oxide nanoparticles supported lipase immobilization for biotransformation in organic solvents: A facile synthesis of geranyl acetate, effect of operative variables and kinetic study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 1630-1651, 2016.

PERNAK, J. et al. Pyrylium sulfonate based ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 4342-4345, 2011.

PING, X. et al. A novel support of MCM-48 molecular sieve for immobilization of penicillin G acylase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 75-81, 2004.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 67-80, 1998.

POOLE, C. F. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 49-82, 2004.

RAZAK, N. N. A.; ANNUAR, M. S. M. Enzymatic synthesis of flavonoid ester: Elucidation of its kinetic mechanism and equilibrium thermodynamic behavior. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, p. 5604-5612, 2015.

ROBINSON, J.; OSTERYOUNG, R. A. Electrochemical and spectroscopic study of some aromatic hydrocarbons in the room temperature molten salt system aluminum chloride-n-butylpyridinium chloride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, p. 323-327, 1979.

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

ROUQUEROL, J. et al. Recommendations for the characterization of porous solids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1739-1758, 1994.

SACHSE, A. et al. Mesoporous zeolite through ionic liquid based surfactant templating. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 217, p. 81-86, 2015.

SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. R. A.; BASRI, M. **New lipases and proteases**. Nova Science Publishers, 122 p. 2006.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-511, 2012.

SALUM, T. F. C. et al. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, p. 197-203, 2008.

SCHREKKER, H. S. et al. Ether-functionalized imidazolium hexafluorophosphate ionic liquids for improved water miscibilities. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 7389-7392, 2007.

SCHUMACHER, K.; GRUM, M.; UNGER, K. K. Novel synthesis of spherical MCM-48. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 27, p. 201-206, 1999.

SCHWANKE, A. et al. **Materiais Mesoporosos: Um caminho acessível**. EDUFRN, 181 p. 2016.

SERRALHA, F. N. et al. Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, p. 303-311, 1998.

SHAMES, I. H. **Mecânica dos Fluidos**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, v. 1, 1999.

SHARIFI, A. et al. [Omim][BF₄], a green and recyclable ionic liquid medium for the one-pot chemoselective synthesis of benzoxazinones. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 1852-1855, 2010.

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

SHIEH, C. J.; AKOH, C. C.; YEE, L. N. Optimized enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 51, p. 371-374, 1996.

SHINZATO, M. C. Remoção de metais pesados em solução por zeólitas naturais: revisão crítica. **Revista do Instituto Geológico**, v. 27-28, p. 65-78, 2007.

SILVA, J. A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012.

SIMÕES, A. S. et al. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, p. 33-38, 2011.

SMART, L.; MOORE, E. **Química del estado sólido, una introducción**, Espanha, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, cap. 5, 1995.

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

SOARES, C. M. F. et al. Imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de proteínas não enzimáticas. In: **XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ**, Campinas-SP, 2000.

- SOUZA, M. C. M. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. 2013. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
- SOUZA, R. L. et al. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using sílica sol-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 141-150, 2013.
- SUTILI, F. K. et al. Aplicação de zeólitas sintéticas como coadjuvante em formulação detergente. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 879-883, 2009.
- SWAIN, C. G. et al. Tetrahexylammonium benzoate, a liquid salt at 25°, a solvent for kinetics or electrochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, p. 2648-2649, 1967.
- TARAMASSO, M.; PEREGO, G.; NOTARI, B. **US Patent** n. 4410 501, 1983.
- TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.
- THOMSON REUTERS. **Web of Science**. Disponível em: <<http://scientific.thomson.com/products/wos/>>. Acesso em: 30 mar. 2017.
- TRODLER, P.; PLEISS, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. **BMC Structural Biology**, v. 8-9, n. 1, p. 1-10, 2008.
- TURRO, N. J. Photochemistry of organic molecules in microscopic reactors. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 1219-1228, 1986.
- UPPENBERG, J. et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.
- VARTULI, J. C. et al. Effect of surfactant/silica molar ratios on the formation of mesoporous molecular sieves: Inorganic mimicry of surfactant liquid-crystal phases and mechanistic implications. **Chemistry of Materials**, v. 6, n. 12, p. 2317-2326, 1994.
- VASCONCELLOS, A. **Sínteses e caracterização de novos catalisadores zeolíticos e sua utilização como suportes inorgânicos para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel**. 2010. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp, São José do Rio Preto.
- VASCONCELLOS, A. et al. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 163, p. 343-355, 2012.
- VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

VISKUPICOVA, J. et al. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. **Food Chemistry**, v. 123, p. 45-50, 2010.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2 ed. Wiley, 1995.

WALDEN, P.; Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. **Bulletin of the Imperial Academy of Sciences (Saint Petersburg)**, v. 1800, p. 405-422, 1914.

WANG, J. et al. Synthesis of ordered MCM-48 by introducing economical anionic surfactant as co-template. **Materials Letters**, v. 78, p. 199-201, 2012.

WASSERSCHIED, P.; KEIM, W. Ionic liquids-new "solutions" for transition metal catalysis. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 39, p. 3772-3789, 2000.

WASSERSCHIED, P.; WELTON, T. **Ionic liquids in synthesis**. VCH-Wiley: Weinheim, Germany, 2 ed. 776 p. 2007.

WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 126-135, 2008.

WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. **Solid State Ionics**, v. 131, p. 175-188, 2000.

WILKES, J. S.; ZAWOROTKO, M. J. Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, n. 13, p. 965-967, 1992.

XIONG, J. et al. Lipase-catalyzed transesterification synthesis of geranyl acetate in organic solvents and its kinetics. **Food Science and Technology Research**, v. 20, p. 207-216, 2014.

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

YATES, T. J. V. et al. Three-dimensional real-space crystallography of MCM-48 mesoporous silica revealed by scanning transmission electron tomography. **Chemical Physics Letters**, v. 418, p. 540-543, 2006.

YIN, C.; LIU, T.; TAN T. Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candida sp.* lipase in organic media. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 81-86, 2006.

YIU, H.; WEIGHT, P. A.; BOTTING, N. P. Enzyme immobilisation using siliceous mesoporous molecular sieves. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 44-45, p. 763-768, 2001.

YOKE, J. T.; WEISS, J. F.; TOLLIN, G. Reactions of triethylamine with copper (I) and copper (II) halides. **Inorganic Chemistry**, v. 2, p. 1210-1216, 1963.

ZHANG, K. et al. Preparation of high-quality MCM-48 mesoporous silica and the mode of action of the template. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2012, n. 26, p. 4183-4189, 2012.

ZHAO, B.; SHI, B.; MA, R. Immobilization of papain on the mesoporous molecular sieve MCM-48. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, p. 436-441, 2005.

APÊNDICE A - Análise de variância e coeficiente de regressão para a atividade de esterificação da imobilização em MCM-48[C₁₆MI]Cl

Análise de variância para a atividade de esterificação da imobilização em MCM-48[C₁₆MI]Cl no DCCR 2² completo

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	141868,08	5	28373,62	20,97
Resíduo	6764,44	5	1352,89	
Falta de ajuste	6691,12	3	2230,37	
Erro puro	73,32	2	36,66	
Total	148632,52	10		

R²: 0,95

F_{tabelado}: 5,05

Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de t e p do DCCR 2² completo para imobilização em MCM-48[C₁₆MI]Cl

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	344,41	3,50	98,52	0,000
X ₁ (L)	-20,61	2,14	-9,61	0,011
X ₁ (Q)	-95,61	2,56	-37,37	0,001
X ₂ (L)	13,76	2,14	6,42	0,023
X ₂ (Q)	-144,96	2,56	-56,66	0,000
X ₁ *X ₂	21,33	3,03	7,04	0,020

X₁: sólido iônico (%) X₂: massa de enzima (g)

APÊNDICE B - Análise de variância e coeficiente de regressão para a atividade de esterificação da imobilização em MCM-48[C₁₄MI]Cl

Análise de variância para a atividade de esterificação da imobilização em MCM-48[C₁₄MI]Cl no DCCR 2² completo

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	63213,82	5	12642,76	31,68
Resíduo	1995,13	5	399,03	
Falta de ajuste	1993,52	3	664,51	
Erro puro	1,61	2	0,80	
Total	65208,95	10		

R²: 0,96

F_{tabelado}: 5,05

Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de t e p do DCCR 2² completo para a imobilização em MCM-48[C₁₄MI]Cl

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	361,40	0,51	714,19	0,000
X ₁ (L)	21,96	0,37	59,97	0,000
X ₁ (Q)	-32,01	0,39	-82,65	0,000
X ₂ (L)	13,71	0,31	44,77	0,000
X ₂ (Q)	-96,05	0,41	-233,88	0,000
X ₁ *X ₂	6,47	0,37	17,66	0,003

X₁: sólido iônico (%) X₂: massa de enzima (g)

APÊNDICE C - Análise de variância para a conversão do acetato de geranila

Análise de variância para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	376,49	6,00	62,75	8,47
Resíduo	29,65	4,00	7,41	
Falta de ajuste	29,62	2,00	14,81	
Erro puro	0,03	2,00	0,01	
Total	406,14	10,00		

R²: 0,93

F_{tabelado}: 6,16

Análise de variância para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	584,07	6,00	97,35	13,18
Resíduo	29,54	4,00	7,39	
Falta de ajuste	29,54	2,00	14,77	
Erro puro	0,00	2,00	0,00	
Total	613,62	10,00		

R²: 0,95

F_{tabelado}: 6,16

APÊNDICE D - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de t e p para a conversão do acetato de geranila

Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de t e p para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	21,56	0,03	634,90	0,00
X ₁	3,22	0,04	80,93	0,00
X ₂	3,07	0,04	77,10	0,00
X ₃	4,23	0,04	106,25	0,00
X ₁ *X ₂	-1,89	0,04	-47,55	0,00
X ₁ *X ₃	-2,07	0,04	-52,08	0,00
X ₂ *X ₃	1,22	0,04	30,56	0,00

X₁: razão molar (álcool/ácido), X₂: concentração da enzima imobilizada (% m/m), X₃: temperatura (°C)

Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de t e p para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	27,66	0,01	3855,93	0,00
X ₁	-2,07	0,01	-246,24	0,00
X ₂	5,81	0,01	690,50	0,00
X ₃	5,09	0,01	604,76	,00
X ₁ *X ₂	-0,12	0,01	-14,03	0,01
X ₁ *X ₃	-0,34	0,01	-40,31	0,00
X ₂ *X ₃	2,99	0,01	355,82	0,00

X₁: razão molar (álcool/ácido), X₂: concentração da enzima imobilizada (% m/m), X₃: temperatura (°C)

APÊNDICE E - Análise de variância para a conversão do butirato de geranila

Análise de variância para a conversão do butirato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	151,21	6,00	25,20	57,57
Resíduo	1,75	4,00	0,44	
Falta de ajuste	1,72	2,00	0,86	
Erro puro	0,03	2,00	0,01	
Total	152,97	10,00		

R²: 0,99

F_{tabelado}: 6,16

Análise de variância para a conversão do acetato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}
Regressão	140,17	6,00	23,36	6,75
Resíduo	13,85	4,00	3,46	
Falta de ajuste	13,72	2,00	6,86	
Erro puro	0,13	2,00	0,06	
Total	154,02	10,00		

R²: 0,91

F_{tabelado}: 6,16

APÊNDICE F - Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t para a conversão do butirato de geranila

Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t para a conversão do butirato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₄MI]Cl

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	13,25	0,04	364,62	0,00
X ₁	3,00	0,04	70,34	0,00
X ₂	2,36	0,04	55,45	0,00
X ₃	1,17	0,04	27,42	0,00
X ₁ *X ₂	-0,31	0,04	-7,36	0,02
X ₁ *X ₃	0,55	0,04	12,97	0,01
X ₂ *X ₃	-1,60	0,04	-37,57	0,00

X₁: razão molar (álcool/ácido), X₂: concentração da enzima imobilizada (% m/m), X₃: temperatura (°C)

Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t para a conversão do butirato de geranila a partir da enzima imobilizada em MCM-48[C₁₆MI]Cl

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	15,91	0,08	210,11	0,00
X ₁	3,66	0,09	41,22	0,00
X ₂	1,65	0,09	18,59	0,00
X ₃	0,59	0,09	6,63	0,02
X ₁ *X ₂	0,51	0,09	5,69	0,03
X ₁ *X ₃	-0,56	0,09	-6,26	0,02
X ₂ *X ₃	0,69	0,09	7,78	0,02

X₁: razão molar (álcool/ácido), X₂: concentração da enzima imobilizada (% m/m), X₃: temperatura (°C)

APÊNDICE G - Produções**1) Artigos completos publicados em periódicos**

- BATTISTON, C., S., Z.; FICANHA, A., M., M.; LEVANDOSKI, K.; DA SILVA, B. A.; BATTISTON, S.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. L. Immobilization of lipase on mesoporous molecular sieve MCM-48 obtained using ionic solid as a structure director and esterification reaction on solvent-free. *Química Nova*, v. 40, p. 293-298, 2017.

2) Resumos expandidos publicados em anais de congressos

BATTISTON, C. S. Z; FICANHA, A. M. M.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. Estabilidade operacional da lipase *Candida Antarctica* B (CALB) imobilizada em MCM-48 utilizando o sólido iônico [C₁₆MI]Cl como direcionador de estrutura. In: II CONIGTI (Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação da URI Erechim) e III CSBEA (Congresso Sul-Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2016, Erechim). Resumos de Trabalhos, 2016.

3) Resumos publicados em anais de congressos

- BATTISTON, C. S. Z; FICANHA, A. M. M.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. Estudo da Estabilidade da lipase *Candida Antarctica* do tipo B (CAL B) imobilizada em MCM-48 utilizando [C₁₄MI]Cl como direcionador de estrutura. In: 2º Congresso Iberoamericano de Ingenieros de los Alimentos, 2016, Punta del este. Resúmenes Trabajos Libres, 2016. p. 84-85.

4) Apresentações de Trabalho

- ZANCHETT, C. S.; FICANHA, A. M. M.; MIGNONI, M.; DALLAGO, R. M. Estabilidade operacional da lipase *Candida Antarctica* B (CALB) imobilizada em MCM-48 utilizando o sólido iônico [C₁₆MI]Cl como direcionador de estrutura. 2016. II

CONIGTI (Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação da URI Erechim) e III CSBEA (Congresso Sul-Brasileiro de Engenharia de Alimentos), 2016, Erechim.

- BATTISTON, C. S. Z.; FICANHA, A. M. M.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. Estudo da Estabilidade da lipase *Candida Antarctica* do tipo B (CAL B) imobilizada em MCM-48 utilizando $[C_{14}MI]Cl$ como direcionador de estrutura. 2º Congresso Iberoamericano de Ingenieros de los Alimentos, 2016, Punta del Este.

5) Patente

- SILVA, B. A.; BATTISTON, C. S. Z.; DALLAGO, R.; MIGNONI, M. L.; PERGHER, S. B. C.; MELGUIZO, P. V.; SCHWANKE, A. J. Título: “Processo de preparação de silicatos mesoporosos LPM-8 e LPM-9 utilizando um derivado do cátion imidazólio”. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170036170, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/02/2017.