

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

ALINE MATUELLA MOREIRA FICANHA

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE *Candida antartica* B (CAL B) EM SÍLICA XEROGEL E
AEROGEL OBTIDOS PELA TÉCNICA SOL-GEL NA PRESENÇA DOS ADITIVOS
POLIETILENOGLICOL E LÍQUIDOS IÔNICOS**

ERECHIM – RS

2017

ALINE MATUELLA MOREIRA FICANHA

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE *Candida antarctica* B (CAL B) EM SÍLICA XEROGEL E
AEROGEL OBTIDOS PELA TÉCNICA SOL-GEL NA PRESENÇA DOS ADITIVOS
POLIETILENOGLICOL E LÍQUIDOS IÔNICOS**

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

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

ERECHIM - RS

2017

ALINE MATUELLA MOREIRA FICANHA

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE *Candida antarctica* B (CAL B) EM SÍLICA XEROGEL E AEROGEL OBTIDOS PELA TÉCNICA SOL-GEL NA PRESENÇA DOS ADITIVOS POLIETILENOGLICOL E LÍQUIDOS IÔNICOS

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

Erechim, 26 de Maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Alexander Junges
Membro da banca (URI-Erechim)

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

Profa. Dra. Ilizandra Aparecida Fernandes
Membro da banca (URI-Erechim)

Profa. Dra. Clarissa Dalla Rosa
Membro da banca (UFFS-Erechim)

Profa. Dra. Luciane Maria Colla
Membro da banca (UPF)

RESUMO

A obtenção das enzimas lipases imobilizadas é um desafio na biotecnologia atual, pois, possuem um papel importante em diversos processos e produtos biotecnológicos. Apresentam desempenho melhor quando comparados a enzima livre, por principalmente possuírem melhor estabilidade operacional e térmica. O que possibilita serem utilizadas em processos que necessitem de faixas mais amplas de temperatura e pH, além de poderem ser recuperadas com maior facilidade do meio reacional e poderem ser utilizadas repetida ou continuamente. Além disso, sua aplicação depende de técnicas eficientes de imobilização e da utilização de suporte apropriado que mantenha a estabilidade enzimática. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para imobilizar enzimas, dentre elas a técnica sol-gel, que permite preparar diferentes materiais com características compatíveis da enzima. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo imobilizar a lipase de *Candida antarctica* B em sílica xerogel e aerogel obtida pela técnica sol-gel na presença dos aditivos polietilenoglicol e líquidos iônicos. Os suportes imobilizados foram preparados utilizando o tetraetilortossilicato como precursor de sílica. A lipase e os diferentes aditivos foram adicionados *in situ* no processo de formação do suporte. Foram utilizados como aditivos o polietilenoglicol 1500 e três diferentes líquidos iônicos (cloreto de 1-butil-3metilimidazólio, brometo de 1-octil-3metilimidazólio, 1 hexadecil-3metilimidazólio). Inicialmente foi realizado um estudo para determinar as condições de secagem (tempo, pressão, temperatura) do aerogel em dióxido de carbono em condições sub e supercríticas. O tempo estudado foi entre 2,5 min a 2 horas. Para selecionar as melhores condições de pressão e temperatura, foi adotada a metodologia de planejamento experimental 3^2 . Para otimizar o processo de imobilização com os diferentes aditivos, foi proposto um delineamento composto central rotacional 2^2 completo com as variáveis aditivo e enzima. Nos suportes otimizados foram realizados o estudo da estabilidade operacional, térmica e de armazenagem. Os resultados para a secagem do aerogel mostraram que o melhor tempo foi de 30 min e as maiores atividades de esterificação foram nas condições nos níveis com valores inferiores de pressão (80bar) e superiores de temperatura (55 °C). No estudo do uso do aditivo polietilenoglicol, o modelo matemático para o processo foi validado e os pontos ótimos determinados foram de 0,09 g/mL de enzima e 0,15 g/mL de aditivo polietilenoglicol para o xerogel e 0,12 g/mL de enzima e 0,20 g/mL de aditivo polietilenoglicol para o aerogel. Os valores de máxima atividade de esterificação e rendimentos foram de 544 U/g, 585 % e 266 U/g, 140 % para xerogel e aerogel, respectivamente. O polietilenoglicol mostrou melhor desempenho na atividade de esterificação e estabilidades como aditivo quando utilizado no xerogel. No estudo dos diferentes líquidos iônicos, os pontos ótimos determinados foram para os líquidos iônicos cloreto de 1-butil-3metilimidazólio, brometo de 1-octil-3metilimidazólio e 1 hexadecil-3metilimidazólio, respectivamente, de 0,30, 0,27 e 0,22 g/mL de enzima e 1,60, 1,52 e 1,52 % de aditivo. A quantidade de enzima e líquidos iônicos utilizados na imobilização com aerogel, foram os mesmos dos valores otimizados no processo da imobilização em xerogel (para cada líquido iônico). Os líquidos iônicos demonstraram serem bons aditivos no processo de imobilização. Quanto a estabilidade operacional, o xerogel, independente do líquido iônico, apresentou maior número de ciclos de utilização e melhor estabilidade térmica em comparação ao aerogel. O melhor desempenho de atividade de esterificação e estabilidade para o aerogel imobilizado foram quando sintetizados e secos sem a presença de aditivo. Para o xerogel, o uso de polietilenoglicol e líquidos iônicos apresentaram resultados satisfatórios para atividade de esterificação e estabilidades.

Palavras-chave: Enzima. Aditivos. Tecnologia supercrítica.

ABSTRACT

Obtaining enzyme immobilized lipase is a challenge in the current biotechnology therefore an important role in many biotechnological processes and products. They present better performance when compared to the free enzyme, mainly because they have better operational and thermal stability. This makes it possible to be used in processes that require broader ranges of temperature and pH, and can be retrieved more easily from the reaction medium and can be used repeatedly or continuously. Moreover, its application depends on efficient immobilization techniques and the use of appropriate support that keeps the enzyme stability. Different techniques can be used to immobilize enzymes, among them the sol-gel technique, which allows to prepare different materials with compatible characteristics of the enzyme. Thus, this work aims at the immobilized *Candida antarctica* lipase B in silica xerogel and aerogel obtained by the sol-gel technique in the presence of additives polyethylene glycol and ionic liquids. The immobilized supports were prepared using silica as the precursor tetraethylorthosilicate. CALB lipase and different additives and *in situ* in formation process. They were used as additive polyethylene glycol 1500 and three different ionic liquids (ILs). Initially a study was carried out to determine the drying conditions (time, pressure, temperature) of aerogel in carbon dioxide under sub and supercritical conditions. The time studied was between 2.5 min to 2 hours. In order to select the best pressure and temperature conditions, the experimental design methodology 3^2 was adopted. In order to optimize the immobilization process with the different additives, a experimental design with additive and enzyme variables was proposed. In the optimized substrates, the study of the operational, thermal and storage stability was carried out. The results for the aerogel drying showed that the best time was 30 min and the highest esterification activities were in the conditions at the lower levels of pressure (80bar) and higher temperature (55 °C). In the study of the use of the polyethylene glycol additive, the mathematical model for the process was validated and the optimum points determined were 0.09 g/mL of enzyme and 0.15 g/mL of polyethylene glycol additive for xerogel and 0.12 g/mL of enzyme and 0.20 g/mL of polyethylene glycol additive to the aerogel. The values of maximum esterification activity and yields were 544 U/g, 585% and 266 U/g, 140% for xerogel and aerogel, respectively. Polyethylene glycol showed better performance on esterification activity and stabilities as an additive when used in xerogel. In the study of the different ionic liquids, the optimum points determined were 1-butyl-3-methylimidazolium chloride, 1-octyl-3-methylimidazolium bromide and 1-hexadecyl-3-methylimidazolium bromide respectively of 0.30, 0.27 e 0.22g/mL enzyme and 1.60, 1.52 and 1.52% additive. The amount of enzyme and ionic liquids used in immobilization with aerogel were the same as those optimized in the immobilization process in xerogel (for each ionic liquid). Ionic liquids proved to be good additives in the immobilization process. Regarding the operational stability, the xerogel, independent of the ionic liquid, presented a greater number of cycles of use and better thermal stability in comparison to the aerogel. The best performance of esterification activity and stability for the immobilized aerogel were when synthesized and dried without the presence of additive. For the xerogel, the use of polyethylene glycol and ionic liquids presented satisfactory results for esterification activity and stabilities.

Keywords: Enzyme. Additives. Supercritical technology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Figura 1.1 - Estrutura da tese.....	19
-------------------------------------	----

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1 - Hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do grupo silanol	25
Figura 2.2 - A condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente a formação do sol e após o gel	25
Figura 2.3 - Etapas da técnica sol-gel para produção de xerogel e aerogel.....	26
Figura 2.4 - Sílicas aerogéis a) aerogel de sílica em partículas; b) monólito de um aerogel flexível à base de sílica; c) monólito de um aerogel de sílica.	28
Figura 2.5 - Diagrama de fases do CO ₂	29
Figura 2.6 - Estrutura química e nomenclatura de cátions e ânions utilizados na síntese de LIs	34

CAPÍTULO 3 – IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SÍLICA AEROGEL

Figura 3.1 - Aparato experimental utilizado para a secagem empregando CO ₂ pressurizado ..	46
Figura 3.2 - Difractogramas de raios X dos aerogéis imobilizados obtidos em diferentes condições de secagem (a) 80 bar e 40 °C, (b) 140 bar e 40 °C, (c) 200 bar e 25 °C.....	52
Figura 3.3 - Isoterma de adsorção-dessorção da sílica aerogel	53
Figura 3.4 - Curva termogravimétrica dos aerogéis com e sem a lipase CALB imobilizada ..	55
Figura 3.5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do aerogel com ampliação de 500 vezes (a) (c) (e) e 1000 vezes (b) (d) (f)	56
Figura 3.6 – Cinética de extração do solvente após a secagem com CO ₂ em diferentes pressões, temperaturas e tempo.....	57
Figura 3.7 - Atividade de esterificação (U/g) da sílica aerogel após a secagem com CO ₂ em diferentes pressões, temperaturas e tempo	59

Figura 3.8 - Curvas de contorno para o planejamento fatorial 3^2 em relação a AE (U/g) e R (%) na secagem do aerogel.....	63
Figura 3.9 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em temperatura ambiente da CALB livre e imobilizada em sílica aerogel nas diferentes condições de secagem.....	64
Figura 3.10 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em refrigeração da CALB livre e imobilizada em sílica aerogel nas diferentes condições de secagem.....	64
Figura 3.11 - Estabilidade operacional da CALB imobilizada em sílica aerogel nas diferentes condições de secagem.....	65
Figura 3.12 - Estabilidade térmica a 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C da lipase CALB livre (a) e imobilizada (b)	66

CAPÍTULO 4 –IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM AEROGEL E XEROGEL COM O USO DE PEG COMO ADITIVO

Figura 4.1 - Atividade de esterificação (colunas) e rendimento (linhas) obtidos nos testes preliminares para a lipase CALB imobilizada em xerogel.....	77
Figura 4.2 - Curvas de contorno da influência da concentração de enzima e aditivo na imobilização de lipase imobilizada em xerogel e aerogel	80
Figura 4.3 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em refrigeração (3°C a 5°C) da CALB imobilizada em sílica xerogel e aerogel.....	82
Figura 4.4 - Estabilidade operacional da CALB imobilizada em sílica xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo	83

CAPÍTULO 5 –IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM AEROGEL E XEROGEL UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS COMO ADITIVO

Figura 5.1 - Síntese do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio	90
Figura 5.2 - Síntese do brometo de 1-octil-3-metilimidazólio	91
Figura 5.3 - Síntese do líquido iônico cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio	91
Figura 5.4 - Isoterma de adsorção-dessorção da sílica aerogel e xerogel com enzima e LIs como aditivo	94
Figura 5.5 - Curva termogravimétrica dos diferentes LIs e dos aerogéis (a) e xerogéis (b) com e sem a lipase CALB imobilizada e imobilizada com os diferentes LIs	97

Figura 5.6 - Atividade de esterificação (colunas) e rendimento (linhas) obtidos nos testes preliminares na imobilização da lipase em xerogel com o uso de três diferentes Lis ((a) C ₄ ; (b) C ₈ e (c) C ₁₆)	99
Figura 5.7 - Curvas de contorno da influência da concentração de enzima e aditivo LIs na atividade de esterificação.....	101
Figura 5.8 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em refrigeração da CALB imobilizada em sílica xerogel e aerogel na presença de diferentes LIs.....	104
Figura 5.9 - Estabilidade operacional da CALB imobilizada em sílica aerogel (a) e xerogel (b) com o uso de diferentes líquidos iônicos como aditivo.....	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3 – IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SÍLICA AEROGEL

Tabela 3.1 - Condições de pressão e temperatura e da densidade do CO ₂ utilizado para secagem	48
Tabela 3.2 - Características morfológicas dos aerogéis	54
Tabela 3.3 - Perda de massa do aerogel com e sem enzima imobilizada e da enzima livre.....	55
Tabela 3.4 - Teste de Tukey para a atividade de esterificação do aerogel imobilizado após secagem com CO ₂ em diferentes condições de secagem de pressão e temperatura (letras maiúsculas nas linhas) e tempos de secagem (letras minúsculas nas colunas)	60
Tabela 3.5 - Atividade de esterificação e rendimento da enzima lipase CALB imobilizada em sílica aerogel para o planejamento fatorial 3 ²	61
Tabela 3.6 - Constante desativação térmica (K _d), os coeficientes de determinação (R ²) e tempos de meia vida (t _{1/2}) da lipase CALB livre e imobilizada.....	67

CAPÍTULO 4 –IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM AEROGEL E XEROGEL COM O USO DE PEG COMO ADITIVO

Tabela 4.1 - Variáveis reais e codificadas testadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel.....	76
Tabela 4.2 - Matriz experimental do DCCR para a atividade de esterificação (AE) da lipase imobilizada em xerogel nas diferentes concentrações de enzima e aditivo	78
Tabela 4.3- Matriz experimental do DCCR para a atividade de esterificação (AE) da lipase imobilizada em aerogel nas diferentes concentrações de enzima e aditivo.....	79
Tabela 4.4 - Validação das variáveis otimizadas descrito pelo modelo matemático.	81
Tabela 4.5 - Constante desativação térmica (K _d), os coeficientes de determinação (R ²) e tempos de meia vida (t _{1/2}) da lipase CALB imobilizada em xerogel e aerogel com e sem a presença de aditivo PEG	84

CAPÍTULO 5 –IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM AEROGEL E XEROGEL UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS COMO ADITIVO

Tabela 5.1 - Variáveis reais e codificadas testadas no Delineamento composto Central Rotacional (DCCR) na imobilização da lipase CALB em xerogel	93
Tabela 5.2 - Características morfológicas dos aerogéis	95
Tabela 5.3 - Perda de massa do aerogel com e sem enzima imobilizada	96
Tabela 5.4 - Matriz experimental do DCCR para a atividade de esterificação (AE) da lipase imobilizada em xerogel nas diferentes concentrações de enzima e aditivo	100
Tabela 5.5 - Níveis codificados e reais obtidos pelo modelo matemático dos valores das variáveis ótimas utilizadas na imobilização da CALB em xerogel para obtenção de máxima AE	102
Tabela 5.6 - Validação das variáveis otimizadas descrito pelo modelo matemático para o xerogel imobilizado com diferentes LIs	103
Tabela 5.7 - AE dos aerogéis imobilizado com diferentes LIs.....	104
Tabela 5.8 - Constante desativação térmica (K_d), os coeficientes de determinação (R^2) e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB imobilizada em xerogel e aerogel com e sem a presença de aditivo LIs.....	108

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem;
°C	Graus Celsius;
AE	Atividade de esterificação (U/g ou U/mL)
AR	Atividade residual (%);
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B;
CO ₂	Dióxido de carbono;
d	Dias;
h	Horas;
LIAs	Líquidos iônicos apróticos;
LIPs	Líquidos iônicos próticos;
LIs	Líquidos iônicos;
M	Molar;
mg	Miligrama;
Min	Minutos;
mL	Mililitros;
P	Pressão;
PEG	Polietilenoglicol;
pH	Potencial de hidrogênio iônico;
R (%)	Rendimento de imobilização (%);
R ²	Coeficiente de determinação;
rpm	Rotação por minuto;
T	Temperatura;
t	Tempo de reação (min);
TEOS	Tetraetilortosilicato;
t _f	Tempo final (min);
t _i	Tempo inicial (min);
U	Unidade de atividade suporte imobilizado (g);
V	Volume de amostra (mL);
V _a	Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);
V _b	Volume de NaOH gasto na titulação do ensaio controle (mL);
V _c	Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL);
V _f	Volume final de meio reacional (mL);

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivo geral.....	18
1.2	Objetivos específicos.....	18
1.3	Estrutura do trabalho	18
1.4	Referências Bibliográficas	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	Lipases	21
2.2	Imobilização enzimática.....	22
2.2.1	Imobilização de lipase	24
2.2.2	Técnica sol-gel.....	24
2.2.2.1	Xerogel.....	27
2.2.2.2	Aerogel.....	27
2.2.3	Fluido supercrítico.....	28
2.2.4	Secagem supercrítica dos géis de síntese	30
2.2.5	Aditivos	31
2.2.5.1	Polietilenoglicol (PEG).....	32
2.2.5.2	Líquidos iônicos (LIs).....	33
2.3	Referências Bibliográficas	36
3	IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SÍLICA AEROGEL	44
3.1	Fundamentação Teórica	44
3.2	Materiais e Métodos	45
3.2.1	Materiais	45
3.2.2	Síntese da sílica e imobilização da lipase CALB em aerogel.....	45
3.2.3	Secagem para obtenção do aerogel imobilizado.....	46
3.2.4	Caracterização morfológica da sílica aerogel.....	48
3.2.4.1	Análise difração de raios X (DRX) e análise textural.....	48

3.2.4.2	Análise Termogravimétrica (ATG)	49
3.2.4.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
3.2.5	Determinações analíticas	49
3.2.5.1	Determinação da atividade de esterificação.....	49
3.2.5.2	Determinação do rendimento da imobilização	50
3.2.5.3	Estabilidade de estocagem	50
3.2.5.4	Estabilidade térmica.....	51
3.2.5.5	Estabilidade operacional	51
3.3	Resultados e Discussão	52
3.3.1	Caracterização morfológica da sílica aerogel.....	52
3.3.1.1	Difratograma de raios X (DRX) e análise textural	52
3.3.1.2	Análise Termogravimétrica (ATG)	54
3.3.1.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	56
3.3.2	Cinética de secagem do aerogel imobilizado	56
3.3.3	Estabilidade de estocagem.....	63
3.3.4	Estabilidade operacional.....	65
3.3.5	Estabilidade térmica	66
3.4	Considerações Parciais.....	68
3.5	Referências Bibliográficas	70
4	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CALB EM AEROGEL E XEROGEL COM O USO DE PEG COMO ADITIVO	73
4.1	Fundamentação Teórica	73
4.2	Materiais e Métodos	74
4.2.1	Enzima e produtos químicos.....	74
4.2.2	Síntese da sílica e imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel.....	74
4.2.3	Determinações analíticas	75
4.2.4	Influência da massa de enzima e aditivo PEG na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel.....	75
4.3	Resultados e Discussão	76

4.3.1	Influência de massas de enzima e aditivo na atividade de esterificação	76
4.3.2	Validação do modelo experimental	81
4.3.3	Estabilidade de estocagem.....	82
4.3.4	Estabilidade operacional.....	82
4.3.4.1	Estabilidade térmica.....	84
4.4	Considerações Parciais.....	85
4.5	Referências Bibliográficas	86
5	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CALB EM AEROGEL E XEROGEL UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS COMO ADITIVO	88
5.1	Fundamentação Teórica	88
5.2	Materiais e Métodos	90
5.2.1	Síntese de líquidos iônicos	90
5.2.1.1	Síntese do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (C ₄).....	90
5.2.1.2	Síntese do brometo de 1-octil-3-metilimidazólio (C ₈).....	90
5.2.1.3	Síntese do cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio (C ₁₆)	91
5.2.2	Síntese da sílica e imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de diferentes LIs como aditivos.....	91
5.2.3	Influência da massa de enzima e aditivo (LIs) na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel.....	92
5.2.4	Caracterização morfológica da sílica aerogel.....	93
5.2.4.1	Análise textural	93
5.2.4.2	Análise Termogravimétrica (ATG)	93
5.3	Resultados e Discussão	94
5.3.1	Análise textural.....	94
5.3.1.1	Análise Termogravimétrica (ATG)	96
5.3.2	Influência de massas de enzima e aditivo na atividade de esterificação	98
5.3.3	Validação do modelo experimental	102
5.3.4	Estabilidades estocagem, operacional e térmica.....	104
5.3.4.1	Estabilidade de estocagem	104
5.3.4.2	Estabilidade operacional	105

5.3.4.3	Estabilidade térmica.....	107
5.4	Considerações Parciais.....	109
5.5	Referências Bibliográficas	110
6	CONCLUSÃO	113
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	115
8	PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	116
8.1	Congressos.....	116
8.2	Periódicos	117
9	APÊNDICES.....	118
	APÊNDICE A – Análise de variância do planejamento fatorial 3^2 para a atividade de esterificação e rendimento dos aerogéis imobilizados	118
	APÊNDICE B – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t obtidos no Planejamento Fatorial 3^2 para a secagem da CALB imobilizada em sílica aerogel.....	119
	APÊNDICE C – Análise de variância do DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo.....	120
	APÊNDICE D – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t obtidos no DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo	121
	APÊNDICE E – Análise de variância do DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel com o uso de diferentes líquidos iônicos como aditivo.....	122
	APÊNDICE F – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t obtidos no DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel com o uso de diferentes líquidos iônicos como aditivo	123

1 INTRODUÇÃO

Na área biotecnológica, a aplicação de enzimas como biocatalisadores em diversos processos torna-se uma alternativa na substituição de metodologias convencionais. Dentre as enzimas em destaque nos processos biotecnológicos, pode-se citar as lipases.

As lipases são enzimas que têm sido utilizadas como biocatalisadores utilizados para uma variedade de reações, devido a sua elevada atividade e seletividade (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KAPOOR; GUPTA, 2012). Dentre as lipases de diferentes fontes, a de *Candida antarctica* B (CALB) é particularmente interessante devido a sua capacidade de catalisar diversas reações, são um dos biocatalisadores mais utilizados em síntese orgânica devido sua resistência a solventes orgânicos, tolerância em meios não aquosos, especificidade e seletividade (FORDE et al., 2010).

Apesar das vantagens da sua utilização como biocatalisadores, sua aplicação prática possui algumas restrições, tais como a baixa estabilidade térmica e operacional, custos com separação do produto e impossibilidade de reutilização (HANEFELD; CAO; MAGNER, 2013; JESIONOWSKI, ZDARTA, KRAJEWSKA, 2014).

Uma estratégia para contornar estes inconvenientes e melhorar sua estabilidade em diferentes meios reacionais é o processo de imobilização. O processo de imobilização consiste em manter o catalisador confinado a um suporte físico, desta forma, torna viável a recuperação/remoção do biocatalisador do meio reacional; permite a utilização repetida ou continuamente, o que possibilita a utilização em processos que operam continuamente; melhora a sua estabilidade, possibilitando faixas mais amplas de temperatura e pH (MENDES et al., 2008; KATO et al., 2011).

A escolha do suporte ou técnica de imobilização torna-se uma etapa importante. O suporte deve apresentar resistência térmica e microbiológica, estabilidade térmica e possuir características compatíveis com a da enzima a ser imobilizada (MOHAMAD et al., 2015). Dentre as técnicas, uma das mais usadas para a imobilização de biomoléculas e outros catalisadores químicos descrita na literatura é o processo sol-gel.

Este processo envolve várias etapas de processos químicos e físicos, associados à hidrólise e polimerização de precursores inorgânicos e secagem. A técnica permite preparar materiais com estruturas distintas, a partir do controle da cinética de transformação, projetando materiais com propriedades pré-definidas, alta pureza, homogeneidade dos produtos e baixa temperatura de processamento (NASSAR et al., 2011).

O processo sol-gel começa a partir de uma solução homogênea com um precursor, solvente e catalisador que, através de reações de hidrólise e condensação, origina uma solução coloidal denominados por *sol*. Por reações de policondensação, o sol se transforma em uma rede integrada, sólida com a fase líquida (solventes, catalisadores) nos interstícios, e esta estrutura tridimensional semi-sólida é chamado *gel* (MILEA; BOGATU; DUTA, 2011). Este gel passa por mais dois processos, o envelhecimento e secagem.

Os suportes obtidos pelas diferentes formas de secagem no processo sol-gel podem ser classificados por xerogel, aerogel, criogel e sonogel. O xerogel é obtido pela secagem por evaporação em condições brandas de pressão e temperatura e o aerogel é obtido pela secagem por extração em meio pressurizado.

A técnica sol-gel permite o uso de aditivos no momento da elaboração do suporte de imobilização. Pesquisas relatam que o uso de aditivos no processo de imobilização, os quais, são utilizados para proteger a enzima, evitando a sua inativação após o processo de imobilização, o que os mantém com maiores atividades enzimática além do aumento da estabilidade (SHELDON; PELT, 2013; BARBOSA et al., 2016).

Os aditivos são capazes de reter a camada de água ao redor do biocatalisador e maximizar os efeitos dispersantes das moléculas da enzima e além disso, são facilitadores de transporte de massa. Dentre os aditivos mais utilizados na imobilização enzimática destacam-se o polietilenoglicol (PEG), o álcool polivinílico e atualmente, os líquidos iônicos (LIs).

O PEG nas suas aplicações como aditivo no processo de imobilização demonstra um aumento da estabilidade e atividade da enzima, pois, melhora a distribuição da enzima no processo de imobilização, modifica nível de hidratação no interior do suporte e reveste a enzima, impedindo mudança na sua estrutura conformacional (OUYANG et al., 2010; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

Os líquidos iônicos demonstram características semelhantes às do PEG no processo de imobilização, além disso, estudos relatam que as altas atividades enzimáticas podem estar ligadas a alteração da conformação enzimática que os LIs provocam, o que faz com que a enzima mantenha sua ativação permanente (BARBOSA et al., 2016). Essas características aliadas as suas propriedades, como baixa pressão de vapor, estabilidade térmica, não-inflamabilidade, torna interessante o uso destes aditivos em processos de imobilização (VIOUX et al., 2010). Porém, o processo de imobilização pela técnica sol-gel com a imobilização *in situ*, ou seja, a adição da enzima no processo de síntese do suporte com e sem o uso de aditivos, ainda é pouco estudado.

1.1 Objetivo geral

Objetivou-se imobilizar a lipase comercial de *Candida antarctica* B (CALB) em sílica xerogel e aerogel obtido pela técnica sol-gel na presença de diferentes aditivos.

1.2 Objetivos específicos

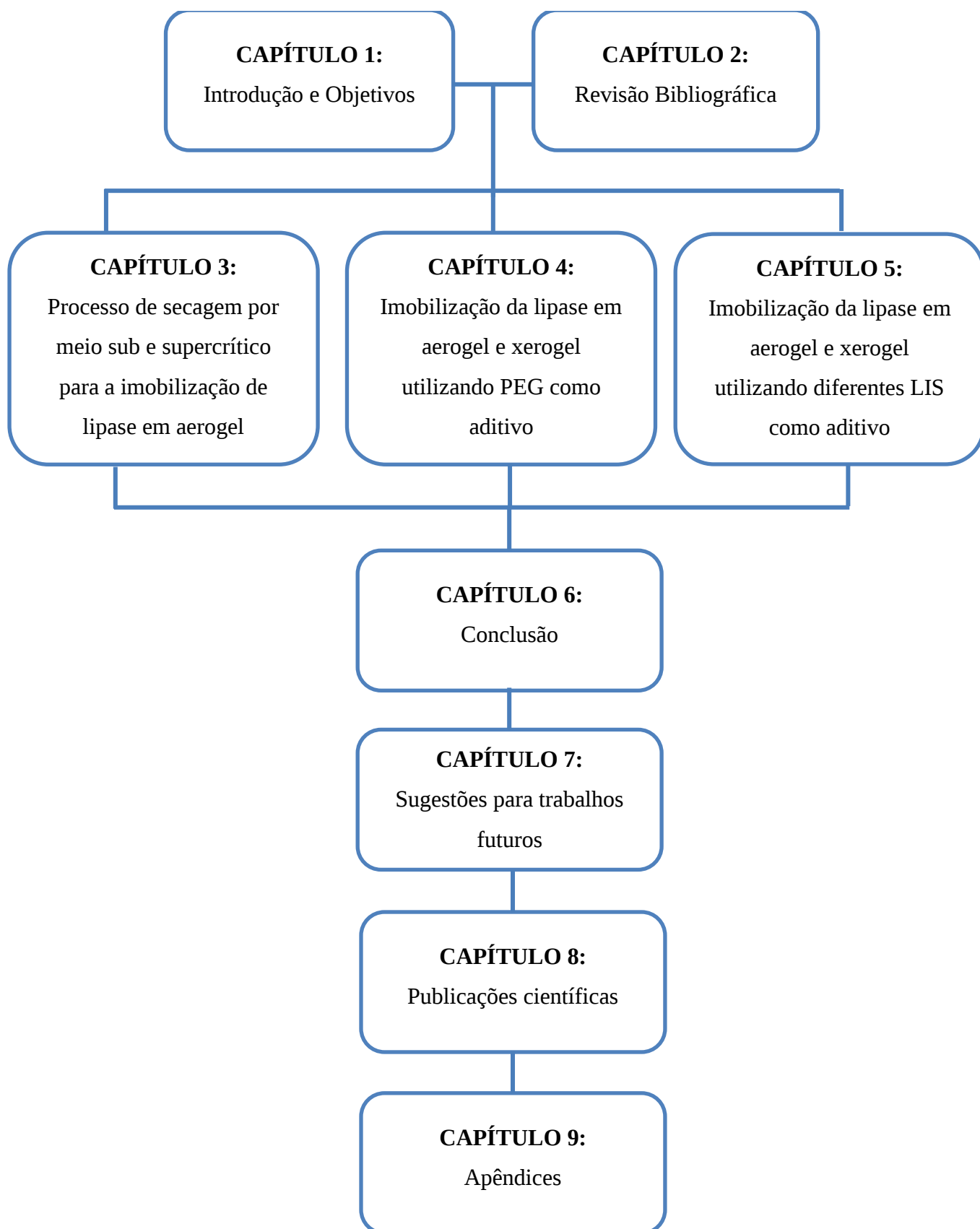
Os objetivos específicos foram:

- a) Estudar e avaliar a influência de diferentes condições (tempo, temperatura e pressão) no processo de secagem do suporte aerogel imobilizado *in situ* com lipase CALB;
- b) Avaliar o efeito da utilização do aditivo PEG no processo de imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel;
- c) Avaliar o efeito da imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel utilizando diferentes líquidos iônicos como aditivos;
- d) Analisar a estabilidade operacional (reciclo), térmica e de estocagem dos diferentes suportes imobilizados obtidos;
- e) Caracterizar morfologicamente os suportes imobilizados obtidos.

1.3 Estrutura do trabalho

Este trabalho está organizado conforme a Figura 1.1. O Capítulo 1 apresenta a introdução e os objetivos do trabalho. O Capítulo 2 traz uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados. O Capítulo 3 aborda o estudo do processo de secagem por meio sub e supercrítico para a obtenção do suporte aerogel imobilizado com a lipase CALB, o estudo da estabilidade e a caracterização dos suportes obtidos. O processo de imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo, bem como o estudo da estabilidade são apresentados no Capítulo 4. O Capítulos 5 aborda a imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de diferentes LIs como aditivo, o estudo da estabilidade e a caracterização dos suportes obtidos. O Capítulo 6 traz as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros. Por fim, o Capítulo 6 apresenta as produções científicas obtidas ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Figura 1.1 - Estrutura da tese



1.4 Referências Bibliográficas

- BARBOSA, A. S. et al. The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. **Química Nova**, v. 39, p. 415-422, 2016.
- 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.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197-212, 2010.
- FORDE, J. et al. Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 203-209, 2010.
- HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, E. Enzyme immobilisation: fundamentals and application. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6211-6212, 2013.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzymes immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p. 801-821, 2014.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.
- KATO, K. et al. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol-gel reactions in ionic liquids. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 119, p. 140-143, 2011.
- MENDES, A. A. et al. Regioselective monohydrolysis of per-o-acetylated-1-substituted β -glucopyranosides catalysed by immobilized lipases. **Tetrahedron**, v. 64, p. 10721-10727, 2008.
- MILEA, C. A.; BOGATU, C.; DUTA, A. The influence of parameters in silica sol-gel process. **Bulletin of the Transilvania University of Brasov**, v. 4, p. 59-66, 2011.
- MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 205-220, 2015.
- NASSAR, E. J. et al. **Biomaterials and sol-gel process: a methodology for the preparation of functional materials**. In: Pignatello, R. (ed) Biomaterials Science and Engineering, 1st ed. Handbook of Bioceramics and Biocomposites, p. 1-12, 2011.
- OUYANG, J. et al. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6685-6691, 2010.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.
- VIOUX, A. et al. Use of ionic liquids in sol-gel; ionogels and applications. **Comptes Rendus Chimie**, v. 13, p. 242-255, 2010.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, será exposta uma breve revisão da literatura sobre lipases, imobilização de lipases, técnica sol-gel, fluidos supercríticos e aditivos os quais correspondem aos principais temas que serão abordados no decorrer do trabalho.

2.1 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) podem ser produzidas por diversos micro-organismos, plantas e animais (HIDALGO; BORNSCHEUER, 2006). Assim como as outras enzimas, as lipases microbianas são mais utilizadas do que as derivadas de plantas ou animais. São geralmente mais estáveis e versáteis devido à possibilidade de altos rendimentos, procedimentos mais simples de obtenção, facilidade de manipulação genética e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios relativamente baratos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; GANDRA et al., 2008; BARBOSA et al., 2011).

São enzimas biotecnologicamente importantes devido a sua versatilidade e propriedades para diferentes aplicações. Possuem como função natural a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol. Entretanto, em ambientes com restrição de água, as lipases têm se mostrado ativas em reações de esterificação (BARON et al., 2005; FICANHA et al., 2015), transesterificação (SEVERAC et al., 2011), interesterificação (NUNES et al., 2010), alcoólise (REINEHR et al., 2014) e aminólise (FORESTI; FERREIRA, 2007).

Podem, também, ser utilizadas de duas formas principais: para catálise biológica com o objetivo de produzir componentes químicos importantes para as diferentes indústrias e, para acelerar a degradação de resíduos gordurosos (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Além disso, diversos estudos demonstram as diferentes aplicações das lipases, tais como: na indústria de alimentos (RADZI et al., 2011; THAKUR; KUMAR; KANWAR, 2012), na indústria química (CHAKRABORTY et al., 2010; MACARIO; GIORDANO, 2013), no tratamento de efluentes (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010; DORS et al., 2013), na indústria têxtil (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), na indústria farmacêutica (GHORAI; SHUKLA; BHATTACHARYYA, 2012), entre outras possíveis aplicações.

Uma das lipases mais utilizadas é a *Candida antarctica* B (CALB), que tem a capacidade de tornar-se adsorvida em interfaces hidrofóbicas e atuar em substratos insolúveis. A lipase CALB tem sido estudada para potenciais aplicações na indústria alimentícia, aromas

(BRÍGIDA et al., 2008; MARTINS et al., 2014), de detergente, farmacêutica (BARBOSA et al., 2010), cosméticos (MONTIEL et al., 2015), biodiesel (SILVA et al., 2012) e oleoquímica (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Estas aplicações são possíveis, devido à sua ampla especificidade para substratos, alta atividade para várias reações sob condições brandas, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica e atuação em uma faixa ampla de pH (RODRIGUES et al., 2008; DENG et al., 2011).

Apesar das diversas possibilidades e a grande utilização nos mais variados processos, as reações catalíticas que envolvem enzimas, alguns aspectos na sua aplicação podem afetar a estabilidade desta enzima na sua forma livre (BOSLEY; PEILOW, 1997; DU et al., 2004). São frequentemente limitadas em termos de estabilidade, e também por dificuldades na recuperação das mesmas para reuso do biocatalisador (SEVERAC et al., 2011).

Nos últimos anos, diferentes técnicas foram aperfeiçoadas ou desenvolvidas para estudo e otimização das reações de biotransformações como, por exemplo, a imobilização enzimática.

2.2 Imobilização enzimática

A definição para imobilização de enzimas foi recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971, que estabelece que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (KENNEDY; CABRAL, 1987).

A imobilização de enzimas desempenha um papel fundamental na biocatálise, tendo em vista que as enzimas estão sujeitas à perda de sua atividade por fatores químicos, físicos e/ou biológicos, durante sua utilização ou até mesmo durante a estocagem. Por essas razões, diferentes métodos de imobilização enzimática têm sido propostos com o objetivo de manter a atividade desses biocatalisadores durante os processos em que são empregados, possibilitando o desenvolvimento de biocatalisadores com um tempo de vida útil satisfatório e elevada sensibilidade (MATEO et al., 2007; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

A imobilização oferece algumas vantagens operacionais às enzimas solúveis, tais como operar em processos contínuos, escolha do término da reação, a formação de produtos controlados, sua fácil separação e adaptabilidade a diversos tipos de reatores (ADRIANO et al., 2005). A imobilização muitas vezes é a chave para melhorar o desempenho operacional da enzima em diferentes reações (SHELDON, 2007).

Há uma tendência no aumento da aplicação de enzimas imobilizadas que mantenham suas propriedades catalíticas e a possibilidade de torná-la reutilizável, o que implica na aceitação comercial destes catalisadores biológicos (DESIMONE et al., 2008; BON et al., 2008).

Há alguns pontos que devem ser evitados ou prevenidos durante a imobilização:

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

As principais vantagens obtidas no processo de imobilização são: aumento das estabilidades térmica, mecânica e operacional, protegendo o sítio ativo da enzima da inativação; permite sua reutilização em outras etapas do processo; redução de custo operacional e fácil separação e recuperação da enzima do meio reacional, reduzindo custo e etapas de purificação do produto (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

De uma forma geral, para um processo de imobilização ser efetivo, o suporte deve permitir o acesso da enzima aos substratos, manter sua atividade por um longo período e

permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

2.2.1 Imobilização de lipase

A lipase CALB, especialmente após a imobilização, é bem reconhecida por tolerar grande variação em condições experimentais, tais como solventes orgânicos polares, baixa atividades de água, pH alcalino e temperatura elevada (TAN et al., 2010; IDRIS e BUKHARI, 2012). Na imobilização, a seleção do método e o suporte para a imobilização da enzima lipase CALB deve ser baseada nas propriedades finais desejadas para o biocatalisador.

Desta forma, na literatura as lipases CALB são imobilizadas por diversos métodos, tais como: adsorção (MILETIC et al., 2009), ligação covalente (RODRIGUES et al., 2008), ligação cruzada (PRABHAVATHI; GUO; XU, 2009) e também encapsulamento e/ou confinamento (NASSREDDINE et al., 2008; CIPOLATTI et al., 2014; FICANHA et al., 2015).

Dentre as técnicas de imobilização, o comportamento da lipase imobilizada pela técnica sol-gel depende da estrutura física do suporte, das propriedades químicas e físicas da lipase utilizada e do método de secagem utilizado, entre eles utilizando-se dessecadores (xerogel) (SOARES et al., 2004) ou gases em condições supercríticas como CO₂ (aerogel) (NASSREDDINE et al., 2008; BARBOSA et al., 2016).

2.2.2 Técnica sol-gel

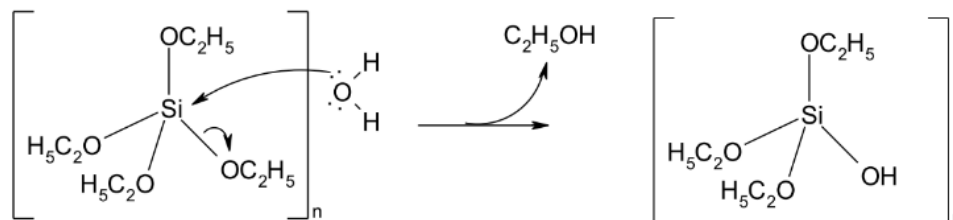
Esta tecnologia consiste na formação de uma solução homogênea que a partir de reações de hidrólise e condensação do precursor origina uma dispersão de partículas coloidais, o *sol* (com dimensão entre 1 e 100 nm, estável em um fluido). Depois, por reações de policondensação, o *sol* é transformado em uma rede sólida com uma fase líquida nos poros, também denominado por *gel* (formada pela estrutura rígida das partículas coloidais, ou de cadeias poliméricas) (ALFAYA; KUBOTA, 2002; DURÃES et al., 2013).

As reações químicas que ocorrem durante a formação do *sol* para o *gel*, influenciam fortemente a composição e as propriedades do produto final (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

A reação de polimerização sol-gel pode ser dividida em duas etapas básicas: na primeira, a hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do tipo silanol; e na segunda, a condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente à formação do sol e, eventualmente,

ao gel (ALFAYA; KUBOTA, 2002), conforme demonstradas nas Figuras 2.1 e 2.2, respectivamente.

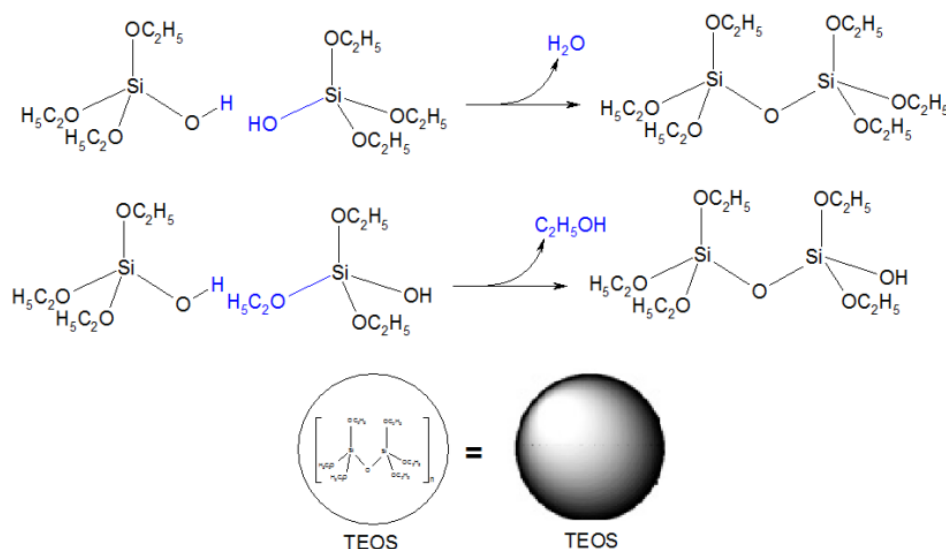
Figura 2.1 - Hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do grupo silanol



Fonte: Boaventura (2013).

A produção de uma matriz sol-gel pode ser iniciada pela hidrólise parcial dos precursores (silicatos de alquilo ou alcoxisilanos) resultando em um oligômero. O oligômero presente é totalmente hidrolisado formando-se uma dispersão coloidal (sol), à qual é adicionada uma solução contendo o biocatalisador, desta forma, inicia-se o processo de poli condensação, que resulta na formação de uma fase distinta contendo o biocatalisador (enzimas). A matriz é envelhecida, resultando no final do processo, nano ou micro matrizes (CABRAL; AIRES-BARROS; GAMA, 2003).

Figura 2.2 - A condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente a formação do sol e após o gel



TEOS: Tetraetilortosilicato.

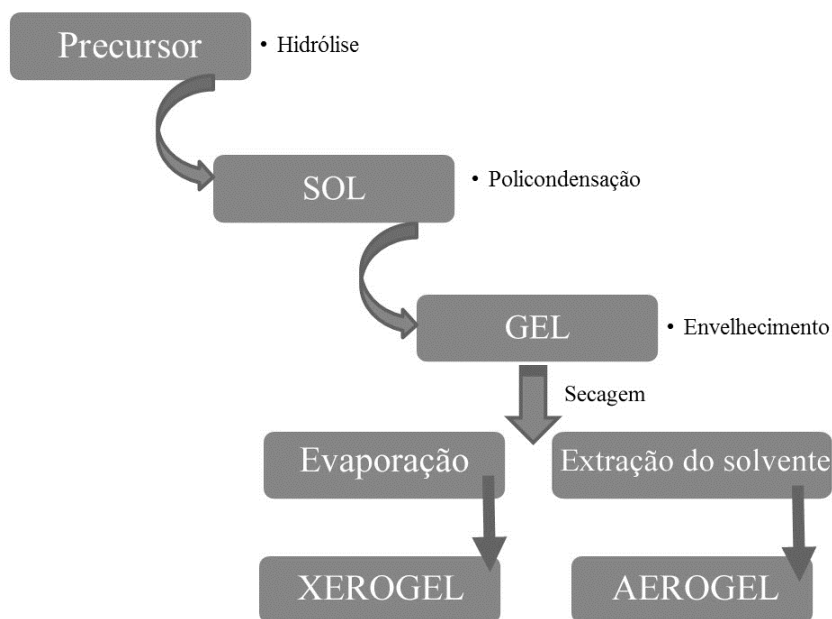
Fonte: Boaventura (2013).

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

Na preparação de materiais com características controladas é de grande importância a compreensão da cinética e das reações envolvidas no processo sol-gel. Estes materiais exibem geometria específica, requer baixas temperaturas, permite controlar a microestrutura do produto através das fases de síntese e secagem, o que possibilita o controle das propriedades dos produtos mediante o tipo de aplicação (DORCHEH; ABBASI, 2008).

Este material passa por uma fase de secagem com o objetivo de extrair o solvente utilizado, mantendo a estrutura do gel inicial praticamente ílesa, originando um aerogel ou xerogel caso esta etapa seja efetuada em condições supercríticas ou à pressão atmosférica (DORCHEH; ABBASI, 2008; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2012). As etapas do processo da formação de um aerogel ou um xerogel pela técnica sol-gel podem ser visualizadas na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Etapas da técnica sol-gel para produção de xerogel e aerogel



Fonte: Autor.

Devido ao seu processo de obtenção e suas características, os aerogéis e xerogéis têm sido aplicados em catálise heterogênea em especial na biocatálise. Estes biocatalisadores são conhecidos, no melhor dos casos, para operar de maneira mais eficiente do que as correspondentes enzimas livres (REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996).

2.2.2.1 Xerogel

Os xerogéis são obtidos pela evaporação natural do solvente e da água, que ocorre em condições ambientes. Os parâmetros de secagem são normalmente controlados pela umidade do ambiente (BASTOS, 2008). O material, após sua secagem, possui uma boa porosidade (25%) e área de superfície específica, além de muitos poros de tamanho pequeno. Porém, por sofrer uma contração significativa durante a secagem, o seu volume pode ser modificado (PESSANHA; COELHO, 2012).

Os parâmetros utilizados no processo sol-gel para obtenção do xerogel podem determinar as características finais dos materiais. Dentre esses parâmetros destacam-se o grupo silanol utilizado como precursor da sílica, como por exemplo o tetraetilortosilicato (TEOS) (LEE et al., 2007; SOUZA et al., 2012) e tetrametilortosilicato (TMOS) (MACARIO et al., 2009; ZARCULA et al., 2010); o iniciador da reação de polimerização, como por exemplo ácido clorídrico (HCl) (LEE et al., 2007; SOUZA et al., 2012), ácido bromídrico (HBr) (FICANHA et al., 2015), ácido fluorídrico (HF) e hidróxido de amônia (NH₄OH) (BARRERA et al., 2013); além do tempo de hidrólise e condensação, a homogeneidade do produto e a razão molar água:silano (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

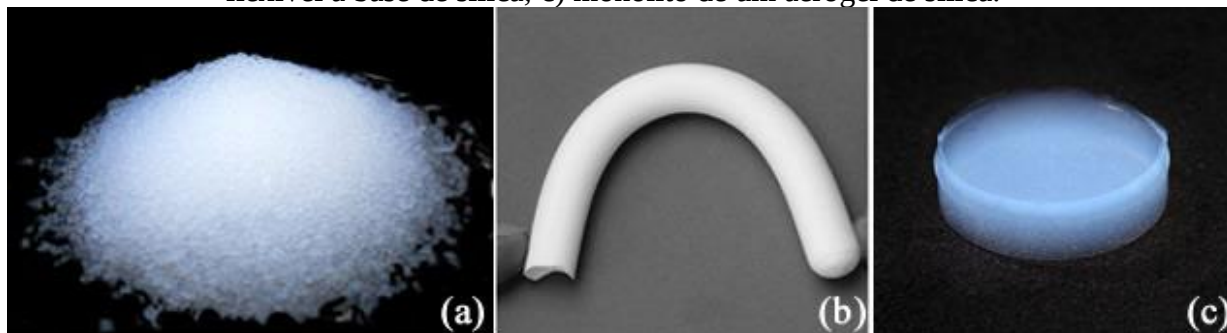
Além dos fatores já citados, porosidade do xerogel está intimamente ligada com o valor do pH e o teor de água presente na reação. Quanto maior forem os teores de água e o valor do pH, materiais mais porosos serão produzidos, e quanto menores forem esses valores, o número de poros é reduzido (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

2.2.2.2 Aerogel

Os aerogéis (Figura 2.4) são materiais porosos sintetizados a partir de diversos precursores moleculares com o uso da tecnologia sol-gel com métodos de secagem especiais (AKIMOV, 2003). Os primeiros estudos realizados para a extração de água e solventes dos poros do gel úmido obtido a partir da técnica sol-gel por dióxido de carbono (CO₂) no meio supercrítico foi realizado por Tewari, Hunt e Lofftus (1985).

Eles são produzidos pela secagem supercrítica dos géis obtidos através de reações de hidrólise e de condensação de um precursor alcóxido de silício, tais como tetraetilortossilicato (TEOS) em um solvente (BRINKER; SCHERER, 1990; BUCKLEY; GREENBLATT, 1994).

Figura 2.4 - Sílicas aerogéis a) aerogel de sílica em partículas; b) monólito de um aerogel flexível à base de sílica; c) monólito de um aerogel de sílica.



Fonte: Aerogel.org

O aerogel com base em sílica é uma classe de sólidos extremamente porosos, leves e resistentes, que podem suportar 500 a 4.000 vezes o seu peso, com uma área superficial específica alta (500-1000 m²/g), baixa densidade (0,003-0,35 g/cm³), baixa condutividade térmica (0,014 W) e bons índices de refração (1,008 e 1,4 m⁻¹K⁻¹). Por essas características ele se torna um suporte interessante para a imobilização de biomoléculas (NOVAK et al., 2003).

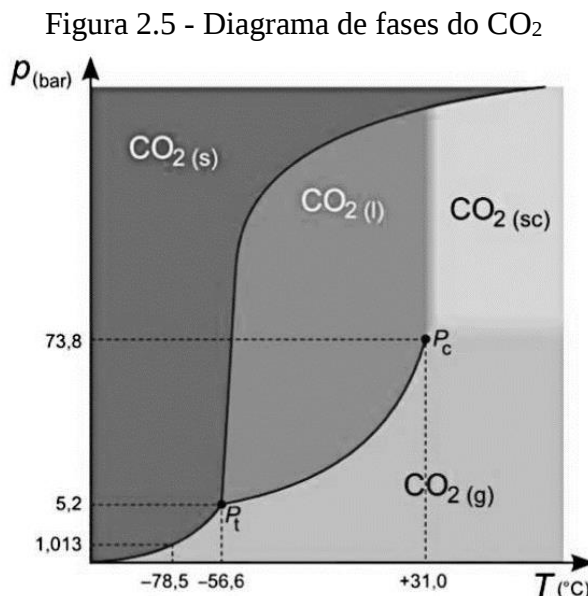
2.2.3 Fluido supercrítico

Um fluido supercrítico é definido como uma substância para as quais, ambas, a pressão e temperatura estão acima dos valores críticos. A densidade de fluidos supercríticos pode ser facilmente ajustada por pequenas mudanças na pressão dentro da região crítica (NALAWADE; PICCHIONI; JANSSEN, 2006).

O emprego de fluidos supercríticos como solventes tem recebido grande atenção porque estes permitem taxas de reação mais altas do que os solventes convencionais. A facilidade de se manipular as propriedades físicas dos fluidos supercríticos possibilita um melhor controle das condições de reação e facilita a remoção do solvente após a reação (TRURECHT et al., 2006; REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007).

O fluido supercrítico possui densidade próxima a do líquido, o que fortalece as suas propriedades de solvente. Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo. Além dessas, a constante dielétrica e o parâmetro de solubilidade podem ser manipulados através da variação da densidade (HABULIN; KNEZ, 2001).

Dentre todos os fluidos que podem ser utilizados como solvente, o mais utilizado é o CO₂, este apresenta ponto crítico em condições relativamente brandas, temperatura crítica de 31,1 °C e pressão crítica de 73,8 bar (Figura 2.5) (DE CONTO, 2012).



Fonte: De Conto (2012)

O poder de solubilização de um solvente é tanto maior quanto mais denso ele for. Acima do ponto crítico, onde a separação entre o líquido e o gás desaparece, a densidade deste gás pode ser modificada com pequenas variações na pressão ou temperatura e com isso, o poder de solvatação do CO₂ supercrítico pode ser controlado (BRENNECKE, 1997).

Esta é uma característica bastante peculiar do fluido supercrítico, que se constitui no princípio fundamental do processo de extração supercrítica. Em síntese, pequenas variações de pressão e/ou temperatura na região supercrítica podem levar a grandes variações da densidade do solvente supercrítico, diretamente relacionada ao seu poder de solubilização (TORRES, 2004).

Além disso, é atóxico, não-inflamável, fácil de ser obtido, é facilmente separado do soluto e de fácil reciclo após o uso e despressurização (HIERRO, 1994).

Estas propriedades fazem dos fluidos supercríticos meios interessantes para reações químicas e enzimáticas (OLIVEIRA et al., 2006; REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007), dentre eles, o CO₂ tem atraído atenção em muitos campos da área científica e tecnológica. Devido às suas excelentes propriedades consideradas ideais para diversas aplicações, incluindo biossensores, tratamento de resíduos (WANG; WU, 2006; BURCHELL et al., 2008; ALNAIEF; SMIRNOVA, 2010; GURAV et al., 2010) e imobilização de enzimas, por possuir

propriedades críticas que evitam a perda de atividade das enzimas (REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996).

2.2.4 Secagem supercrítica dos géis de síntese

Os aerogéis são produzidos por secagem em meio supercrítico, com fluido pressurizado, ou seja, pela extração do componente líquido (solvente) presente no gel. O solvente é substituído pelo CO₂ sub ou supercrítico, que permite ao solvente ser vagarosamente retirado, sem causar um colapso da rede sólida do gel devido a tensão superficial e a capilaridade, o que ocorre no processo de evaporação convencional (HÜSING; SCHUBERT, 1998).

Não havendo diferença na densidade entre a fase gasosa e a fase líquida, a tensão superficial do solvente desaparece e, quando utilizado para a secagem de aerogel, preserva a estrutura dos poros da sílica (DE CONTO, 2012).

Na secagem por meio supercrítico, tanto a temperatura quanto a pressão são ajustados para atingir valores acima dos pontos críticos do solvente correspondente. Ao atingir a temperatura e pressão de ajuste, as condições são mantidas constantes para um determinado período de tempo (DORCHEH; ABBASI, 2008).

A substituição do solvente líquido por um solvente gasoso sob condições supercríticas diminui consideravelmente o encolhimento do aerogel, pois as perturbações exercidas pelo líquido na rede de géis são praticamente excluídas. Isso pode ser explicado pelo fato de que as interfaces de líquido-vapor são eliminadas (PESSANHA; COELHO, 2012).

Neste ponto, não há interface líquido-vapor e, portanto, não há nenhuma pressão capilar. Por secagem a pressão ambiente, a tensão superficial entre o líquido e o vapor não pode ser evitada. A tensão dentro do gel é proporcional à viscosidade do líquido dos poros, a taxa de secagem é inversamente proporcional à permeabilidade do gel úmido (BRINKER; SHERER, 1990).

Os parâmetros importantes a serem considerados na secagem são a força gel, o tamanho dos poros do gel e o solvente, além da temperatura e pressão utilizados na secagem. O pequeno tamanho dos poros pode induzir a fratura durante a secagem devido as forças capilares. O líquido no interior dos poros está sob uma enorme tensão, quando o tamanho do poro for menor do que 200 Å. Por outro lado, quando o tamanho do poro for maior do que 200 µm, o encolhimento será menor e a fissura vai ser menor (RAO; HARANATH, 1999).

Por outro lado, em alguns casos, géis de tamanho de poro pequeno (40 Å) são mais fáceis de secar do que tamanho de poro maiores, o que é explicada por uma teoria da cavitação (SCHERER; SMITH, 1995).

Com efeito, estas propriedades únicas fazem dos aerogéis baseados em sílica adequados para inúmeras aplicações, tais como, para a construção de isolamento (JENSEN; SCHULTZ; KRISTIANSEN, 2004), catalisadores, sensores e filtros para gases poluentes em função de sua estrutura porosa muito alta e controlada. Outros aplicativos do aerogel incluem absorção de impacto e espaçadores para eletrodos de vácuo (GURAV et al., 2010) além de suportes para imobilização enzimática (NASSREDDINE et al., 2008; BARBOSA et al., 2016).

O uso de aerogéis e xerogéis como suportes na imobilização de enzimas vem sendo estudado na presença ou ausência de aditivos (NASSREDDINE et al., 2008; KHARRAT et al., 2011; BARBOSA et al., 2016), a fim de aumentar a atividade catalítica das enzimas imobilizadas.

Os aditivos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades do suporte e controle de porosidade. Além disso, esse tipo de procedimento vem crescendo principalmente, pois, o processo pode se tornar propício à grande escala de produção e aplicação, devido ao maior poder de reutilização das enzimas quando imobilizadas e estabilizadas (ZARCULA et al., 2009).

Assim, a atividade e a estabilidade das enzimas imobilizadas podem gerar um melhoramento significativo quando o procedimento de imobilização for realizado na presença de aditivos.

2.2.5 Aditivos

Os aditivos têm sido utilizados no processo de imobilização de enzimas para produzir biocatalisadores imobilizados com maior eficiência. As modificações físicas, químicas e morfológicas dos suportes devido ao uso de aditivos, podem produzir enzimas imobilizadas com maior estabilidade devido à minimização dos efeitos difusionais de substratos e produtos durante a reação, além da melhoria da estabilidade operacional em processos contínuos e descontínuos (ISPAS, SOKOLOV, ANDREESCU, 2009; SHELDON; PELT, 2013).

Além disso, o uso de aditivos pode auxiliar na alteração da hidratação da enzima ou redução do encolhimento do gel (REETZ et al., 2003). As moléculas de água, que se encontram ao redor da enzima, exercem um papel importante na estabilidade e conformação estrutural

devido, principalmente, a sua influência nas interações hidrofóbicas, além das forças de Van der Waals, pontes salinas e pontes de hidrogênio (YAMANE et al., 1990; FABER, 1997).

A escolha do aditivo a ser utilizado no processo de imobilização, está associada ao tipo de fenômeno no sistema imobilizado, tais como: proteção da enzima contra a inativação durante a etapa de imobilização; retenção da camada de água ao redor do biocatalisador, efeitos dispersantes das moléculas da enzima e facilitadores de transporte de massa (SOARES et al., 2005; HARA et al., 2010). Os aditivos devem assegurar a estabilidade e reutilização da enzima e, conseqüentemente, melhorando a relação custo-benefício do processo. Pode-se também aumentar o tempo de meia-vida, isto é, a estabilidade térmica. Contudo, caso essa estratégia seja feita de forma inadequada poderá afetar adversamente a estabilidade e o desempenho total do sistema imobilizado (KHARRAT et al., 2011; BARBOSA et al., 2016).

São exemplos de aditivos eficientes utilizados para imobilização de lipases nos suportes obtidos pela técnica sol-gel: o polietilenoglicol (PEG), líquidos iônicos (LIs), álcool polivinílico, caseína, gelatina e albumina (REETZ; ZONTA; SIMPELKAMP, 1996; VILLENEUVE et al., 2000; SOARES et al., 2003, 2004 e 2005; HARA et al., 2010).

O uso de aditivos na imobilização pela técnica sol-gel torna-se um fator de interesse, pois, a enzima pode ser imobilizada juntamente com o aditivo durante o processo de imobilização (SAKAI-KATO; ISHIRA 2009).

2.2.5.1 Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero não iônico, hidrofílico e que pode formar ligações diretas com a água (MAHONEY; TALBERT; GODDARD, 2012), formado a partir do etilenoglicol. Polímeros solúveis, como o PEG, além de muito utilizados na indústria farmacêutica, são utilizados na purificação de proteínas (ANDREWS; SCHMIDT; ASENJO, 2005), como aditivo macromolecular durante a produção da sílica pela técnica sol gel (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015), na estabilização ou a alteração da função de enzima além de melhorar a atividade de enzimática (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008; OUYANG et al., 2010), impedindo uma mudança de sua estrutura protéica (ROCHA; GIL; GARCIA, 1998; VILLENEUVE et al., 2000).

A natureza e a interação do aditivo no interior da matriz sol-gel podem proporcionar um mecanismo para manipular a dinâmica e a acessibilidade das biomoléculas e assim, melhorar a atividade e estabilidade das biomoléculas aprisionadas (GUPTA; CHAUDHURY, 2007), pois, concede melhor a distribuição da enzima na superfície do suporte, o que permite um melhor

contato com o substrato e favorece uma condição necessária para a expressão da atividade enzimática (SOARES et al., 2004).

Também, a presença de PEG durante o processo de imobilização de lipase, provavelmente, afeta o nível de hidratação da enzima, modificando a hidrofiliabilidade do microambiente (ROCHA; GIL; GARCIA, 1998).

Soares et al. (2006), avaliaram diferentes tipos de aditivos considerando a atividade hidrolítica, bem como a estabilidade operacional de derivados imobilizados de lipase de *Candida rugosa* em sílica de porosidade controlada. Entre os aditivos testados, o polietilenoglicol (1500) proporcionou um considerável aumento da atividade hidrolítica, além de reduzir a desativação térmica da enzima.

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

2.2.5.2 Líquidos iônicos (LIs)

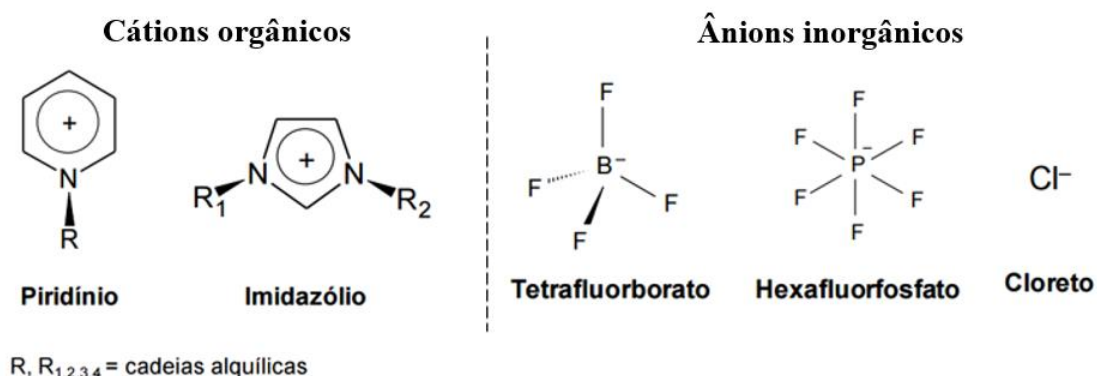
Os LIs são compostos formados na sua maioria por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico (SINGH; SINGH; CHANDRA, 2014; MAI; AHH; KOO, 2014). Os cátions ou ânion utilizados determinam as propriedades químicas e físicas, bem como a sua estabilidade (WEI; IVASKA 2008).

Com base no seu comportamento químico, LIs são divididos em dois grupos: líquidos iônicos apróticos (LIAs) e líquidos iônicos próticos (LIPs). Os LIAs também são considerados como LIs "convencionais" ou "clássico" já que suas estruturas são baseadas principalmente em cátions orgânicos, como imidazólio ou piridínio e de ânions como Cl^- , Br^- , BF_4^- e PF_6^- (PERIC et al., 2013).

Os LIPs, por outro lado, são geralmente preparados por reação de neutralização de uma base orgânica e de um ácido, ou seja, pela transferência de prótons a partir de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted (GREAVES et al., 2006). Até o momento, os LIs apróticos têm recebido mais atenção do que as LIs próticos.

Na Figura 2.6 são apresentados alguns exemplos de estruturas químicas de cátions e ânions comumente empregados na síntese de LIs (SUN; ARMSTRONG, 2010).

Figura 2.6 - Estrutura química e nomenclatura de cátions e ânions utilizados na síntese de LIs



Fonte: adaptada de Sun e Armstrong (2010)

Essas estruturas explicam o fato de muitos LIs apresentarem-se na forma líquida e outros sólidos à temperatura ambiente (WEI; IVASKA, 2008).

As possibilidades de ajustar as propriedades dos LIs permitem o desenvolvimento de produtos e processos mais eficientes, pois através de várias combinações de cátions e ânions, é permitida a produção desses solventes para aplicações específicas (ALVAREZ et al., 2011; MATTEDI et al., 2011).

Os LIPs são não inflamáveis, não voláteis (por possuir pressão de vapor desprezível), possuem amplo intervalo de equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico, alta capacidade de solvatação para diversos tipos de materiais, possui uma excelente estabilidade química e térmica (ASLANOV, 2011).

Devido às suas propriedades, os LIs têm sido utilizadas para várias aplicações, tais como solventes em extrações (DIETZ, 2006), processos de polimerização (KUBISA, 2004), nanotecnologia (ANTONIETTI et al., 2004), solventes em catálise (ZHANG, 2006) na biocatálise como solventes (SU et al., 2016), agentes de modificação superficial da sílica (SOUZA et al., 2013) e aditivos na imobilização de enzimas (BARBOSA et al., 2016).

Além dessas aplicações, observou-se o uso promissor destes solventes como aditivos na imobilização de enzimas. Dependendo da sua natureza, os LIs podem ser capazes de estabilizar enzimas, protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima e/ou pela alteração conformacional o que ocasiona a ativação permanente da enzima (HARA et al., 2010).

Os LIs e as enzimas, bem como a sua aplicação, foram descritos há muito tempo na literatura, porém o potencial de sua combinação vem se tornando tema de estudos. Os LIs foram recentemente sugeridos como agentes que podem estabilizar as enzimas, protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima podendo causar mudanças conformacionais que levam à ativação da enzima (HARA et al., 2010).

Sua utilização durante o processo de imobilização da lipase pela técnica sol-gel é apresentada na literatura. Na maioria, limitados à obtenção de xerogel imobilizado (KHARRAT et al., 2011; SOUZA et al., 2013). No que se refere aerogéis, estudos são limitados utilizando LIs na matriz com a secagem com fluidos pressurizado (BARBOSA et al., 2016).

A adição de LIs em processos biocatalíticos podem proporcionar maior seletividade e estabilidade à enzima (PARK; KAZLAUKAS, 2003), gerando interesse ao uso destes aditivos em processos de imobilização (VIOUX et al., 2010).

A influência positiva do uso do LIs como aditivo em processo enzimático foi verificada por Zarcula et al. (2010) onde utilizaram o tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazólio ([C₈Mim][BF₄]) na imobilização da lipase pela técnica sol-gel em matrizes híbridas. O biocatalisador imobilizado apresentou rendimento da atividade enzimática superior a 100 %.

A utilização de LIAs também foi estudada como aditivo na imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei*. Os resultados demonstraram que a afinidade da enzima para o substrato foi aumentada na presença de LIAs mais hidrofóbicos (MATEO et al., 2007). Os LIs à base de cátions apróticos, principalmente imidazólio, apresentaram resultados satisfatórios na imobilização de enzimas.

2.3 Referências Bibliográficas

- ADRIANO, W. S. et al. Stabilization of *Penicillin* G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 529-538, 2005.
- AEROGEL. **Open Surce Aerogel**. Disponível em :<www.aerogel.org>. Acesso em 03.07.15.
- AKIMOV, Y. K. Fields of application of aerogels (Review). **Instruments and Experimental Techniques**, v. 46, p. 287-299, 2003.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
- ALNAIEF, M.; SMIRNOVA, I. Effect of surface functionalization of silica aerogel on their adsorptive and release properties. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, p. 1644-1649, 2010.
- ALVAREZ, V. H. et al. Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxy ethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}. **Journal Chemistry Thermodynamics**, v. 43, p. 997-1010, 2011.
- ANDREWS, B. A.; SCHMIDT, A. S.; ASENJO, J. A. Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 380-390, 2005.
- ANTONIETTI, M. et al. Ionic liquids for the convenient synthesis of functional nanoparticles and other inorganic nanostructures. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 4988-4992, 2004.
- ASLANOV, L. A. Ionic liquids: Liquid structure. **Journal of Molecular Liquids**, v. 162, p. 101-104, 2011.
- BARBOSA, A. S. et al. The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. **Química Nova**, v. 39, p. 415-422, 2016.
- BARBOSA, O. et al. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 124-132, 2011.
- BARBOSA, O. et al. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). **New Biotechnology**, v. 27, p. 844-850, 2010.
- BARON, A. M. et al. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 25-32, 2005.
- BARRERA, E. G. et al. Ethylene polymerization using metallocene catalyst supported on hybrid indenyl silica produced by sol-gel process. **Applied Catalysis A: General**, v. 462-463, p. 1-7, 2013.

- BASTOS, M. B. **Estudo de Obtenção de Revestimento de Elementos Combustíveis para Reatores FBR**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2008.
- BOAVENTURA, R. F. **Imobilização de lipase por diferentes metodologias na presença de líquidos iônicos e aplicação na produção de esteres etílicos derivados de óleo de girassol**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade Tiradentes. Aracajú-SE, 2013.
- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2008.
- BOSLEY, J. A.; PEILOW, A. D. Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 107-111, 1997.
- BRENNECKE, J. F. Solvents: Molecular Trees for Green Chemistry. **Nature**, v. 389, p.333-334, 1997.
- BRÍGIDA, A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 173-187, 2008.
- BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-Gel Science-The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**. Academic Press. Inc.: San Diego, 1990.
- BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. J. The sol-gel preparation of silica-gels. **Chemistry Education**, v. 7, p. 599-602, 1994.
- BURCHELL, M. J. et al. Characteristics of cometary dust tracks in stardust aerogel and laboratory calibrations. **Meteoritics and Planetary Science**, v. 43, p. 23-40, 2008.
- CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Ed. Lidel-Edições Técnicas, Lisboa, 2003.
- 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.
- CHAKRABORTY, K. et al. Preparation of eicosapentaenoic acid concentrates from sardine oil by *Bacillus circulans* lipase. **Food Chemistry**, v. 120, p. 433-442, 2010.
- CIPOLATTI, E. P. et al. Current status and trends in enzymatic nano immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56-67, 2014.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, p. 1-14, 2012.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DE CONTO, C. **Aerogels obtained by using supercritical carbon dioxide**. Trabalho de conclusão, Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimique, Université de Lorraine. Nancy, France, 2012.

- DENG, L. et al. Synthesis of wax esters by lipase-catalyzed esterification with immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 978-982, 2011.
- DESIMONE, M. F. et al. Effects of relative humidity on enzyme activity immobilized in sol-gel-derived silica nanocomposites. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 583-588, 2008.
- DIETZ, M. L. Ionic liquids as extraction solvents: where do we stand? **Separation Science and Technology**, v. 41, p. 2047-2063, 2006.
- DORCHEH, A. S.; ABBASI, M. H. Silica aerogel: synthesis, properties and characterization. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 199, p. 10-26, 2008.
- DORS, G. et al. Simultaneous enzymatic hydrolysis and anaerobic biodegradation of lipid-rich wastewater from poultry industry. **Applied Water Science**, v. 3, p. 343-349, 2013.
- DU, W. et al. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 125-129, 2004.
- DURÃES, L. et al. Silica based aerogel-like materials obtained by quick microwave drying. **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik**, v. 44, p. 380-385, 2013.
- FABER, K. Biotransformation of non-natural compounds: State of the art and future development. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 1613-1632, 1997.
- FICANHA, A. M. M. et al. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v. 38, p. 364-369, 2015.
- FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 3ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2002.
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Analysis of the interaction of lipases with polypropylene of different structure and polypropylene-modified glass surface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 294, p. 147-155, 2007.
- GANDRA, K. M. et al. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 182-192, 2008.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A. et al. Supercritical drying of aerogel using CO₂: Effect of extraction time on the end material textural properties. **Supercritical Fluids**, v. 66, p. 297-306, 2012.
- GHORAI, M. K.; SHUKLA, D.; BHATTACHARYYA, A. Syntheses of chiral β - and γ -amino ethers, morpholines, and their homologues via nucleophilic ring-opening of chiral activated aziridines and azetidines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 3740-3753, 2012.
- GREAVES, T. L. et al. Protic Ionic Liquids: Solvents with Tunable Phase Behavior and Physicochemical Properties. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 110, p. 22479-22487, 2006.

- GUPTA, R.; CHAUDHURY, N. K. Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2387-2399, 2007.
- GURAV, J. L. et al. Ambient Pressure Dried TEOS-Based Silica Aerogels: Good Absorbents of Organic Liquids. **Journal of Material Science**, v. 45, p. 503-510, 2010.
- HABULIN, M.; KNEZ, Z. Activity and stability of lipases from different sources in. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 1260-1266, 2001.
- HARA, A. P. et al. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 129-134, 2010.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HIDALGO, A.; BORNSCHEUER, U. T. **Direct evolution of lipases and esterases for organic synthesis**, 1st ed. New York, CRC Press, Taylor and Francis, 2006.
- HIERRO, M. T. G. **Temas Avanzados de Análisis Químicas**. Edinford S. A., Madrid, 1994.
- HÜSING, N.; SCHUBERT, U. Aerogels-airy materials: chemistry, structure and properties. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 110, p. 22-47, 1998.
- IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 550-63, 2012.
- ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S.; Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 43-554, 2009.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.
- JENSEN, K.; SCHULTZ, J.; KRISTIANSEN, F. Development of windows based on highly insulating aerogel glazings. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 350, p. 351-357, 2004.
- KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Enzyme Technology**. In: Biotechnology - A Comprehensive Treatise in 8 vol. Editor John F. Kennedy, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, v. 7, USA, 1987.
- KHARRAT, N. et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1083-1089, 2011.
- KUBISA, P. Application of ionic liquids as solvents for polymerization processes. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 3-12, 2004.
- LEE, S. H. et al. Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 57-61, 2007.
- MACARIO, A. et al. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, p. 334-340, 2009.

- MACARIO, A.; GIORDANO, G. Catalytic conversion of renewable sources for biodiesel production: a comparison between biocatalysts and inorganic. **Catalysis Letters**, v. 143, p. 159-168, 2013.
- MAHONEY, K. W.; TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Effect of polyethylene glycol tether size and chemistry on the attachment of lactase to polyethylene films. **Journal of Applied Polymer**, v. 127 p. 1203-1210, 2012.
- MAI, N. L.; AHH, K.; KOO, Y. Methods for recovery of ionic liquids - A review. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 872-881, 2014.
- MARTINS, A. B. et al. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 18-25, 2014.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.
- MATTEDI, S. et al. High pressure CO₂ solubility in N-methyl-2-hydroxyethylammonium protic ionic liquids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 224-230, 2011.
- MILETIC, N. et al. Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins. Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196-201, 2009.
- MONTIEL, M. C. et al. Synthesis of cetyl ricinoleate catalyzed by immobilized Lipozyme® CalB lipase in a solvent-free system. **Catalysis Today**, v. 255, p. 49-53, 2015.
- NALAWADE, S.P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L.P.B.M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 19-43, 2006.
- NASSREDDINE, S. et al. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. **Journal Applied Catalysis A: General**, v. 344, p. 70-77, 2008.
- NOVAK, Z. et al. Silica aerogels as supports for lipase catalyzed esterifications at sub-and supercritical conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 27, p. 169-178, 2003.
- NUNES, G. F. M. et al. Modificações bioquímicas da gordura de leite. **Química Nova**, v. 33, p. 431-437, 2010.
- OLIVEIRA, D. et al. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 373-382, 2006.
- OUYANG, J. et al. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6685-6691, 2010.
- PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids-advantages beyond green technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 432-437, 2003.
- PERIC, B. et al. (Eco) toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 99-105, 2013.

- PESSANHA, N. F. N.; COELHO, G. L. V. Silica aerogels prepared with supercritical carbon dioxide. **Journal of Solids and Structures**, v. 6, p. 11-26, 2012.
- PRABHAVATHI, D.; GUO, Z.; XU, X. Characterization of cross-linked lipase aggregates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 637-642, 2009.
- RADZI, S. M. et al. Green synthesis of butyl acetate, a pineapple flavour via lipases catalyzed reaction. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 59, p. 677-680, 2011.
- RAO, A. V.; HARANATH, D. Effect of methyltrimethoxysilane as a synthesis component on the hydrophobicity and some physical properties of silica aerogels. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 14, p. 267-273, 1999.
- REETZ, M. T. et al. Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts. **Advanced Synthesis e Catalysis**, v. 345, p. 717-728, 2003.
- REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 527-534, 1996.
- REINEHR, C. O. et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, p. 454-460, 2014.
- REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 272-280, 2007.
- ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA F. A. P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 61-67, 1998.
- RODRIGUES, D. et al. Multipoint covalente immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.
- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 126-131, 2010.
- SAKAI-KATO, K.; ISHIKURA, K. Integration of biomolecules into analytical systems by means of silica sol-gel technology. **Analytical Sciences**, v. 25, p. 969-978, 2009.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advanced**, v. 30, p. 489-511, 2012.
- SCHERER, G. W.; SMITH, D. M. Deformation of aerogels during characterization. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 186, p. 309-315, 1995.
- SEIDEL, A. et al. **Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology**. Hardcover, 1084 p., 2007.

- SEVERAC, E. et al. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 61-70, 2011.
- SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289-1307, 2007.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.
- SILVA, J. 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.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012.
- SINGH, M. P.; SINGH, R. K.; CHANDRA, S. Ionic liquids confined in porous matrices: Physicochemical properties and applications. **Progress in Materials Science**, v. 64, p. 73-120, 2014.
- SOARES, C. M. F. et al. Characterization of sol-gel bioencapsulates for hydrolysis and synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 845-859, 2005.
- SOARES, C. M. F. et al. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 69-76, 2006.
- SOARES, C. M. F. et al. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v. 26, p. 832-838, 2003.
- SOARES, C. M. F. et al. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 307-319, 2004.
- SOUZA, R. L. et al. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 152-159, 2012.
- SOUZA, R. L. et al. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 141-150, 2013.
- SU, F. et al. Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid. **Renewable Energy**, v. 90, p. 329-335, 2016.
- SUN, P.; ARMSTRONG, D. W. Ionic liquids in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, p. 1-16, 2010.
- TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.
- TEWARI, P. H.; HUNT A. J.; LOFFTUS, K. D. Ambient-temperature supercritical drying of transparent silica aerogel. **Materials Letters**, v. 3, p. 363-367, 1985.
- THAKUR, A.; KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Production of n-propyl cinnamate (musty vine amber flavor) by lipase catalysis in a non-aqueous medium. **Current Biotechnology**, v. 1, p. 234-240, 2012.

- TORRES, E. B. de M. **Estudo dos processos de destilação molecular para a obtenção de alfa-tocoferol (vitamina E) e de extração supercrítica para a obtenção de alfa-tocoferol e beta-caroteno (pró-vitamina A)**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade de Campinas, Campinas- SP, 2004.
- TRURECHT, K. J., et al. Kinetics of enzymatic ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide. **Macromolecules**, v. 39, p. 7967-7972, 2006.
- VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VIOUX, A. et al. Use of ionic liquids in sol-gel ionogels and applications. **Comptes Rendus Chimie**, v. 13, p. 242-255, 2010.
- WANG, C. T.; WU, C. L. Electrical sensing properties of silica aerogel thin films to humidity. **Thin Solid Films**, v. 496, p. 658-664, 2006.
- WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 126-135, 2008.
- YAMANE, T. et al. Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene: Factors affecting activity of pure enzyme. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 1063-1069, 1990.
- ZARCULA, C. et al. Improvement of lipase catalytic properties by immobilization in hybrid matrices. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 52, p. 179-184, 2009.
- ZARCULA, C. et al. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p.79-86, 2010.
- ZHANG, Z. C. Catalysis in ionic liquids. **Advances in Catalysis**, v. 49, p. 153-237, 2006.

3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SÍLICA AEROGEL

3.1 Fundamentação Teórica

As lipases possuem capacidade de catalisar diversas reações, assim, é utilizado como biocatalisador industrial em química, alimentos, farmacêutica, agroquímica e biotecnologia. É utilizado com sucesso em uma variedade de reações de hidrólise e esterificação (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; KUMAR et al., 2013).

Porém, as suas aplicações podem ser limitadas devido à sua baixa estabilidade, estrutura instável e custos de separação no final do processo (JAFARIZADEH; JAHANIAN; BERENJIAN, 2012). Estes inconvenientes podem ser contornados pela reutilização enzimática e pela melhoria da estabilidade enzimática proporcionada pelo processo de imobilização (BRADY; JORNDAN, 2009). A imobilização enzimática representa a incorporação de moléculas enzimáticas sobre ou em estruturas, através da ligação a um suporte, reticulação ou encapsulamento (ANSARI; HUSAIN, 2012).

O material do suporte, tanto quanto o mecanismo de incorporação empregado, podem afetar diretamente na eficiência do processo de imobilização, mais precisamente na atividade da enzima imobilizada. Em relação as lipases, diferentes suportes, formas de incorporação e mecanismos de imobilização são propostos pela literatura (WU et al., 2009).

Nos últimos anos tem crescido o interesse por materiais que permitam a incorporação da enzima *in situ* durante a etapa de síntese do suporte. Neste contexto, destacam-se os materiais obtidos pela técnica sol-gel como xerogéis (FICANHA et al., 2015) e aerogéis de sílica. Os aerogéis poderem ser sintetizados em condições brandas de temperatura e pH, apresentam outras propriedades atrativas a um suporte, como densidade baixa, alta porosidade, alta área superficial específica, baixa constante dielétrica e bom isolamento térmico (SCHWERTFEGER; FRANK; SCHMIDT, 1998; DORCHEH; ABBASI, 2008).

No caso dos aerogéis de sílica, os quais são sintetizados por gelificação e envelhecimento de um sol (partícula coloidal) de sílica, seguido de remoção do solvente no gel úmido por secagem em alta pressão, estas propriedades podem ser controladas a partir do precursor de alcóxido (tetrametoxissilano (TMOS) ou tetraetoxissilano (TEOS)) (DORCHEH; ABBASI, 2008) e das condições de secagem (tipo de gás, pressão, taxa de despressurização e densidade) empregadas na etapa de remoção do solvente (AEGERTER; LEVENTIS; KOEBEL, 2011). Esses materiais são utilizados em muitas aplicações, dentre as quais se destacam na biocatálise (NASSREDDINE et al., 2008; BARBOSA et al., 2016).

Neste contexto, objetivou-se estudar a influência de diferentes condições (tempo, pressão e temperatura) de secagem do imobilizado de aerogel contendo a lipase CALB incorporada *in situ* durante sua síntese.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Materiais

A lipase comercial *Candida antarctica* (CALB) líquida foi obtida pela Novozyme (Bagsvaerd, Denmark). Os produtos químicos utilizados para a síntese de sol-gel foram tetraetilortosilicato (TEOS Sigma-Aldrich) como precursor da sílica, hidróxido de amônio (Quimex), ácido bromídrico (Vetec) como catalisador e água destilada. Para determinação da atividade de esterificação foram utilizados etanol (Merck), acetona (Merck) e hidróxido de sódio (Synth). Os substratos utilizados na reação de esterificação foram ácido oleico (Aldrich) e etanol (Merck). Para a secagem do suporte para obtenção do aerogel foi utilizado dióxido de carbono (CO₂) como solvente (White Martins).

3.2.2 Síntese da sílica e imobilização da lipase CALB em aerogel

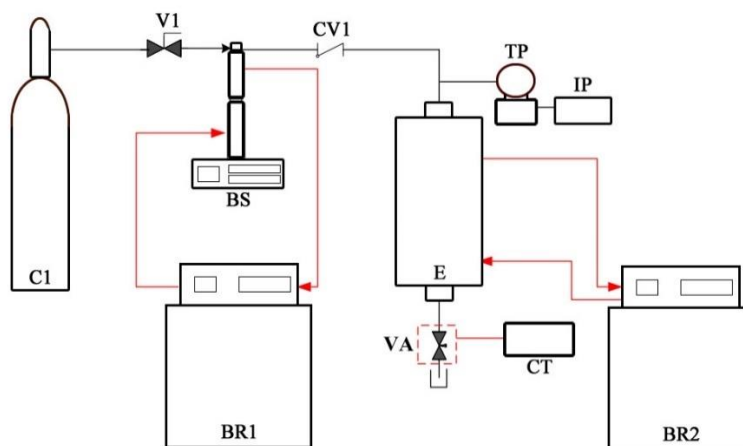
A lipase de *Candida antarctica* (CALB) foi imobilizada pela técnica de sol-gel, com o uso do tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor da sílica, seguindo metodologia descrita na literatura (FICANHA et al., 2015). Inicialmente, 5 mL de TEOS foram dissolvidos em 5 mL de etanol absoluto. Após a dissolução, adicionou-se 1,6 mL de água destilada e três gotas do iniciador da reação de polimerização ácido bromídrico (HBr). Posteriormente, os sistemas reacionais foram submetidos a uma etapa de homogeneização em agitador orbital (shaker) a 40 °C e 180 rpm, por um período de 90 min. Em seguida, fez-se a adição de 1 mL da solução enzimática contendo 0,1 g de enzima, e 1,75 mL da solução hidrolisante (solução etanólica de hidróxido de amônio 1,0 mol/L). Posteriormente, os sistemas reacionais foram mantidos em condições estáticas, em temperatura entre 20 °C e 25 °C, por 24 h para completar a condensação química.

Após o término da etapa de condensação, os imobilizados foram submetidos a uma etapa de secagem empregando CO₂ em meio sub e supercrítico. Posteriormente a secagem, foram obtidas lipases imobilizadas em sílica, denominadas aerogel imobilizado.

3.2.3 Secagem para obtenção do aerogel imobilizado

A secagem dos imobilizados na matriz sol-gel foi realizada empregando CO_2 pressurizado em condições sub e supercríticas. O aparato experimental utilizado para a secagem empregando CO_2 pressurizado é apresentado na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Aparato experimental utilizado para a secagem empregando CO_2 pressurizado



Fonte: Adaptado de Barbosa et al. (2016).

C1: Cilindro de CO_2 ; V1: Válvula de Esfera; BS: Bomba de alta pressão tipo seringa; BR1 e BR2: Banho de recirculação; CV1: Válvula de uma via; TP: Transdutor de pressão de volume zero; IP: Indicador Universal; E: Extrator; VA: Válvula métrica tipo agulha; CT: Controle de temperatura (termopar).

O procedimento utilizado para a secagem em meio pressurizado para obtenção do aerogel, foi realizado da seguinte forma:

- Após o processo de policondensação (etapa inicial da imobilização), a secagem foi realizada com o emprego de CO_2 sub e supercrítico, para retirar o excesso de água e solventes.
- Inicialmente o banho de recirculação (BR1) foi ligado a uma temperatura de 7°C , a fim de manter constante a temperatura da bomba de alta pressão do tipo seringa (BS). Quando a temperatura da bomba se manteve a 7°C , o cilindro de CO_2 (C1) foi aberto para encher a bomba de alta pressão tipo seringa com CO_2 .
- Esta bomba de seringa possui um reservatório interno encamisado (cilindro da bomba), possível saber o volume de CO_2 dentro do reservatório em uma dada pressão e temperatura, através da mudança da pressão de vapor da bomba de seringa. Dessa forma, era necessário conhecer a densidade do solvente como líquido comprimido na pressão e temperatura do cilindro da bomba. Por isso, a temperatura do banho de recirculação (BR1) foi mantida constante em 7°C .
- A enzima imobilizada (previamente pesada) foi adicionada ao interior do extrator e a abertura superior deste foi então fechada com uma tampa. A parte inferior do extrator foi

fechada juntamente com um filtro de aço sintetizado, sobreposto com um papel filtro, para impedir a passagem do material (enzima imobilizada).

- e) O banho de recirculação (BR2) utilizado para manter constante a temperatura no extrator foi ligada e a temperatura experimental ajustada (conforme o planejamento experimental). Quando a temperatura experimental atingiu o valor estabelecido, foi iniciado o bombeamento do CO₂ para dentro do extrator com o auxílio da bomba (BS) até a pressão estabelecida.
- f) Quando a pressão e a temperatura alcançaram o valor desejado, o sistema ficou estático por 10 min para permitir a absorção do solvente na matriz da enzima imobilizada.
- g) Durante este tempo, o sistema de aquecimento da válvula (VA) foi ligado a uma temperatura de aproximadamente 80 °C.
- h) Após os 10 min, a válvula (VA) foi aberta até uma vazão constante de 2 mL/min (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2012).
- i) O tempo de secagem (2,5, 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 min) foi avaliado em diferentes pressões e temperaturas para a obtenção do aerogel imobilizado. A escolha dos valores de pressão (80 bar a 200 bar), e temperatura (25 °C a 55 °C) foram realizadas considerando o valor da densidade do CO₂ em cada condição de temperatura e pressão, calculada empregando a equação de estado de Peng-Robinson (Tabela 3.1). A escolha dessa faixa de tempo foi determinada considerando o solvente retido após a secagem e a atividade da enzima após a secagem.
- j) Após cada experimento de secagem, as amostras foram pesadas para estimativa do teor de solvente retido na matriz da sílica aerogel imobilizado com a enzima.

O efeito da temperatura (X_1) e pressão (X_2) na secagem em CO₂ do aerogel imobilizado foi avaliado mediante o emprego de um planejamento fatorial 3². A escolha dos valores das variáveis temperatura e pressão foram realizadas levando em consideração a densidade do CO₂. As respostas acompanhadas foram a atividade de esterificação dos imobilizados obtidos e o rendimento de imobilização.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 3.1 - Condições de pressão e temperatura e da densidade do CO₂ utilizado para secagem

(X ₁) Temperatura (°C)	(X ₂) Pressão (bar)	Densidade do CO ₂ (g/cm ³)
-1 (25)	-1 (80)	0,7207
-1 (25)	0 (140)	0,8540
-1 (25)	+1 (200)	0,9232
0 (40)	-1 (80)	0,2848
0 (40)	0 (140)	0,7265
0 (40)	+1 (200)	0,8309
+1 (55)	-1 (80)	0,2093
+1 (55)	0 (140)	0,5744
+1 (55)	+1 (200)	0,7309

X₁: valores codificados para a temperatura; X₂: valores codificados para a pressão.

O tempo de secagem foi determinado após a realização da cinética de extração do solvente, realizada durante 120 min. Cada ensaio foi realizado em duplicata, nas condições de temperatura e pressão a serem empregadas no ponto central do planejamento, ou seja, de 40 °C e 140 bar, respectivamente. A eficiência da obtenção do aerogel foi avaliada pela atividade de esterificação (AE) e o rendimento da imobilização (R%). Os resultados obtidos para esta etapa foram tratados pela comparação de médias (Teste de Tukey).

3.2.4 Caracterização morfológica da sílica aerogel

Os materiais obtidos foram caracterizados por difração de raios X, análise textural de adsorção/dessorção de N₂, área superficial (BET), análise termogravimétrica (ATG) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.2.4.1 Análise difração de raios X (DRX) e análise textural

Os aerogéis foram caracterizados por difração de raios X (DRX) (Rigaku, Miniflex II, Ka- 1,58 Cu). As áreas superficiais específicas dos aerogéis sintetizados com e sem enzima foram determinadas com o uso do método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). O volume e o diâmetro médio dos poros foram calculados pelo método de BJH. Para a análise da área superficial, previamente, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico a 60 °C com pressão reduzida, por 12 h. A análise foi realizada em temperatura constante de -196 °C (77 K).

3.2.4.2 Análise Termogravimétrica (ATG)

As análises termogravimétricas foram realizadas nas amostras do aerogel com e sem enzima imobilizada. As curvas de ATG foram obtidas pelo equipamento DTG-60H simultâneo com o DTA-TG Shimadzu e analisados no software Thermogravimetric Analyser, tomando por base a perda da massa em função da temperatura. Foram utilizadas como condições operacionais a razão de aquecimento de 20°C/min, na faixa de temperatura ambiente a 600 °C e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

3.2.4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura JEOL/EO com tensão de 20 kV e ampliações de 500 e 1000 vezes. Cada amostra foi fixada em uma fita dupla face presente na face superior de um cilindro de alumínio. O material foi recoberto por uma fina camada de ouro por eletro-vaporização.

3.2.5 Determinações analíticas

As determinações analíticas descritas a seguir foram as utilizadas em todos os experimentos do presente trabalho.

3.2.5.1 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação de síntese de oleato de etila utilizando ácido oleico e álcool etílico na razão molar de 1:1 (mistura padrão), conforme descrito por Ficanha et al. (2015). A reação foi iniciada pela adição de 0,1 g da enzima imobilizada ou livre em 5 mL da mistura padrão. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados a 40 °C, em agitador orbital a 160 rpm, durante 40 min. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas do meio reacional. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) a fim de parar a reação. A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,05 mol/L até o meio reacional atingir pH 11. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido oleico por minuto nas condições experimentais estabelecidas apresentadas anteriormente. Todas as determinações de atividade enzimática foram feitas em triplicadas.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido graxo por minuto, calculada pela Equação 3.1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_c} \quad (3.1)$$

Onde: AE: Atividade de esterificação (U/g); V_a : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL); V_b : Volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL); M: Molaridade da solução de NaOH; V_f : Volume final de meio reacional (mL); t: Tempo (minutos); m: Massa da solução enzimática ou do suporte utilizado (g); V_c : Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

3.2.5.2 Determinação do rendimento da imobilização

O rendimento de imobilização nos aerogéis foram calculados pela porcentagem da razão entre a atividade total de esterificação do aerogel imobilizado e a atividade de esterificação total da massa de enzima livre adicionada na etapa de imobilização, conforme a Equação 3.2.

$$R (\%): \frac{U_x}{U_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Onde: U_x corresponde à atividade total de esterificação da massa de xerogel sintetizado e U_0 representa a atividade total de esterificação presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização.

3.2.5.3 Estabilidade de estocagem

A estabilidade de estocagem é um parâmetro importante que deve ser avaliado, uma vez que seu estudo permitirá determinar por quanto tempo o biocatalisador imobilizado poderá ser armazenado e quanto de sua atividade inicial será mantida ao longo do período de estocagem. Foram realizadas em temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) e refrigeração (3 °C - 5 °C). A estabilidade foi acompanhada até atingir uma perda de 50% de sua atividade de esterificação inicial. Os resultados foram apresentados em porcentagem da atividade residual (AR), calculada pela Equação 3.3.

$$AR (\%): \frac{AE_i}{AE_0} \times 100 \quad (3.3)$$

Onde: AE_i : atividade de esterificação no tempo “i”, AE_0 da atividade de esterificação no tempo inicial.

3.2.5.4 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das lipases CALB livre e imobilizada foi determinada pelo método de Arrhenius. A partir dos dados obtidos durante a avaliação da estabilidade térmica determinou-se a cinética de degradação através da análise da ordem de reação.

Foi realizada por meio da incubação das enzimas em temperaturas de 40 °C a 80 °C. Amostras foram retiradas ao longo do tempo de incubação para a realização da atividade de esterificação (descrita no item 3.2.5.1) e determinação da atividade residual (AR).

A constante de desativação térmica (k_d) em cada temperatura foi calculada segundo o modelo cinético de Arrhenius, considerando-se que a inativação das enzimas segue a cinética de primeira ordem, conforme Equação 3.4.

$$A = A_0 \exp. (-k_d \cdot t) \quad (3.4)$$

A partir das constantes de desativação térmica em cada temperatura, foram obtidos os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) (Equação 3.5) que corresponde ao tempo necessário para que ocorra a inativação de 50 % da concentração enzimática inicial, na temperatura testada.

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k_d} \quad (3.5)$$

Onde: A_0 : atividade inicial, A : atividade final, t : tempo, $t_{1/2}$: tempo de meia vida e k_d : constante de desativação.

3.2.5.5 Estabilidade operacional

A eficiência da estabilidade operacional (reuso) da lipase imobilizada *in situ* em aerogel foi determinada empregando uma quantidade definida do imobilizado em sucessivos ciclos de síntese de oleato de etila. Após cada batelada, o meio reacional (fase líquida) foi removido com o auxílio de uma pipeta, mantendo a fase sólida (aerogel imobilizado) e, após, adicionado uma nova solução de ácido oleico e etanol. A atividade residual (AR) de cada ciclo foi calculada como apresentado na Equação (3.6).

$$AR (\%): \frac{AE \text{ no ciclo } n}{AE \text{ no ciclo } 1} \times 100 \quad (3.6)$$

3.3 Resultados e Discussão

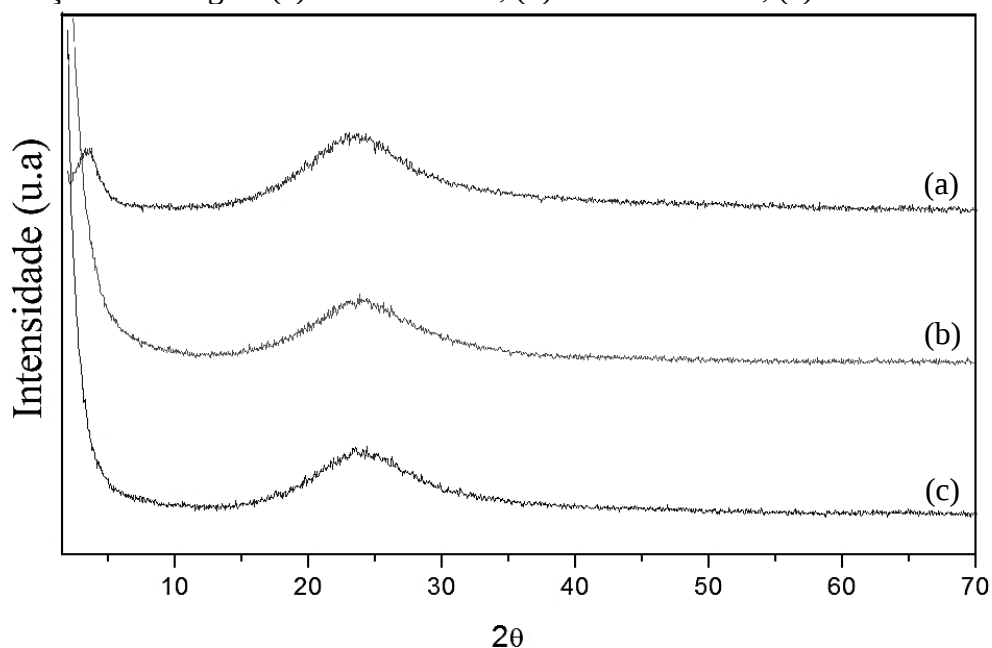
3.3.1 Caracterização morfológica da sílica aerogel

3.3.1.1 Difratoograma de raios X (DRX) e análise textural

A caracterização da porosidade do aerogel de sílica, seja pura ou contendo enzimas imobilizadas, é um fator importante pois auxilia a compreensão dos resultados da atividade enzimática.

Os difratogramas de raios X referentes aos aerogéis obtidos com diferentes condições de secagem, na presença da enzima lipase, são apresentados na Figura 3.2.

Figura 3.2 - Difratoogramas de raios X dos aerogéis imobilizados obtidos em diferentes condições de secagem (a) 80 bar e 40 °C, (b) 140 bar e 40 °C, (c) 200 bar e 25 °C



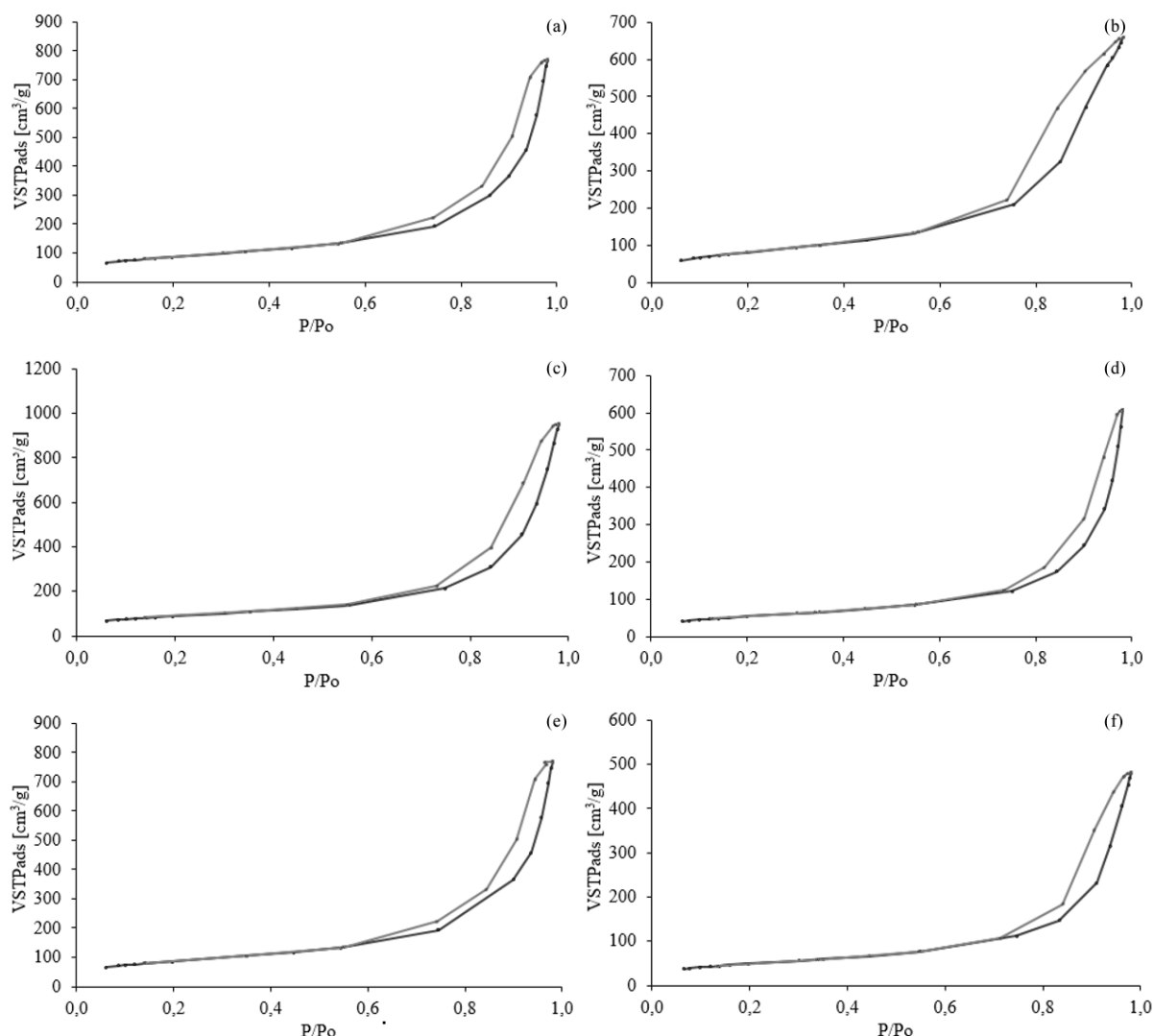
Todos os aerogéis imobilizados exibem um mesmo comportamento em relação a seus difratogramas, não apresentando picos que caracterizam materiais cristalinos, e sim halos na região concebida entre 15-30° (2θ), o que os caracterizam como materiais sem ordenação cristalina, ou seja, como materiais amorfos.

A estrutura amorfa de materiais obtidos pela técnica sol-gel foi descrita por Hench et al. (1992), no qual relatam que as reações de hidrólise e condensação do monômero de silício em presença de um catalisador ácido (HBr) atuam como agente de ligação cruzada com a formação da estrutura amorfa SiO_2 , na qual o reticulado tridimensional é formado ao redor da enzima.

As isotermas de adsorção-dessorção de N_2 , área superficial específica, volume de poros específico (V_p) e diâmetro (dp) das matrizes hidrofóbicas e biocatalisadores imobilizados foram determinados a partir de medidas de adsorção-dessorção de nitrogênio, que é um método utilizado para a caracterização de materiais microporosos e mesoporosos. A análise textural mostra os resultados em relação à área de superfície específica (método BET), volume de poros e diâmetro médio dos poros para as matrizes de sol-gel e os seus derivados (SOUZA et al., 2012).

Os resultados das análises texturais de adsorção/dessorção de N_2 realizadas nos aerogéis com e sem a presença da lipase CALB obtidos por diferentes condições de secagem são apresentados na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Isoterma de adsorção-dessorção da sílica aerogel



(a) 80 bar e 40°C sem enzima; (b) 80 bar e 40°C com enzima; (c) 140 bar e 55°C sem enzima; (d) 140 bar e 55°C com enzima; (e) 200 bar e 25°C sem enzima; (f) 200 bar e 25°C com enzima

Os aerogéis, independente da condição de secagem, apresentaram isoterma do tipo IV, que são tipicamente exibidas por materiais mesoporosos (GREGG; SING, 1982), como a sílica e com histerese do tipo H2, a qual corresponde a uma distribuição de tamanhos e formas de poros definida, com poros em forma de “tinteiro”, com gargalo estreito e corpo largo de acordo com a classificação IUPAC.

Os aerogéis são predominantemente sólidos mesoporosos. Devem suas propriedades proeminentes, como baixas densidades, mesoporosidades e elevada área superficial, a esta estrutura (HÜSING; SCHUBERT, 1998; CUCE et al., 2014).

As distribuições de tamanho de poro, área superficial e volume de poros dos aerogéis determinadas pelo método BJH são apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Características morfológicas dos aerogéis				
Aerogel	Condição secagem	Área superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Tamanho de poro (Å)
Com enzima	80 bar e 40°C	297,41	1,01	135,35
Com enzima	140 bar e 55°C	197,83	0,90	182,25
Com enzima	200 bar e 25°C	179,70	0,73	163,12
Sem enzima	80 bar e 40°C	324,21	1,45	188,16
Sem enzima	140 bar e 55°C	312,92	1,17	186,04
Sem enzima	200 bar e 25°C	304,66	1,10	178,11

Observa-se para todos os aerogéis, independentemente da condição de secagem, que a área superficial, o volume e o tamanho de poro reduzem com o uso da enzima. Esta estrutura mesoporosa fornece espaço para a imobilização da lipase de CALB. Também devido área superficial, este suporte pode facilitar a captação do substrato e assim auxiliar no aumento do rendimento de imobilização e a atividade da lipase imobilizada (ZHANG, GE; LIU, 2015).

3.3.1.2 Análise Termogravimétrica (ATG)

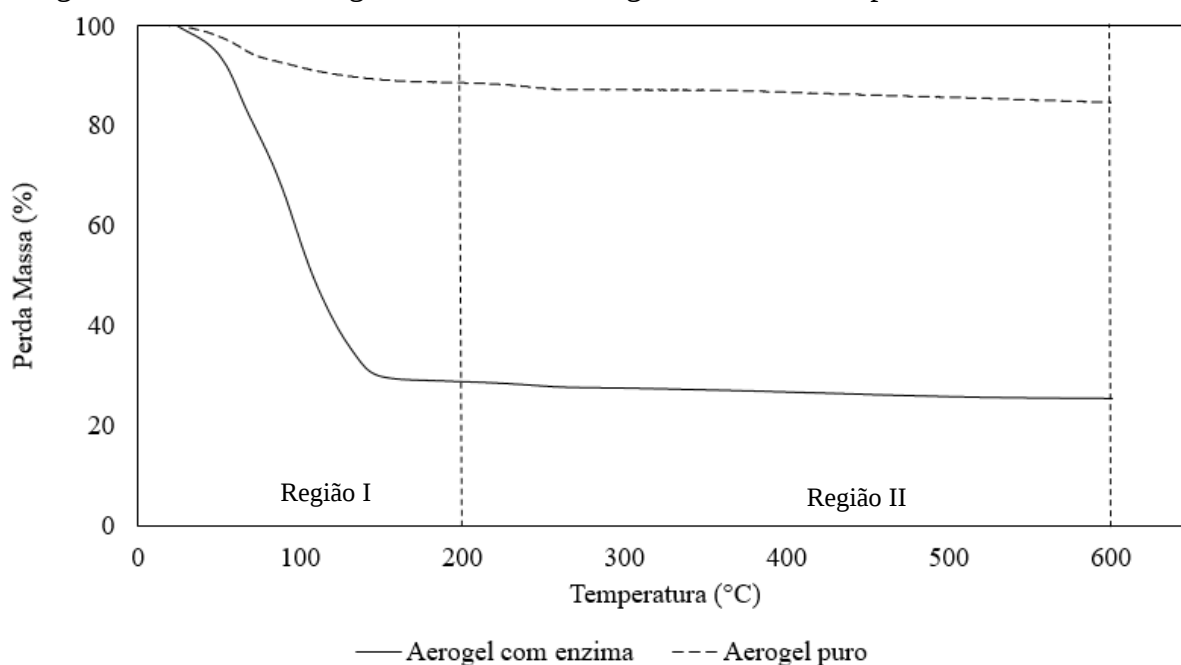
A perda de massa da lipase CALB livre e dos aerogéis com e sem a enzima foi determinada por análise termogravimétrica (ATG). Esta técnica permite a determinação do intervalo de temperatura em que as amostras aquecidas sofrem alteração conformacional, apresentando um perfil de perda de massa. A perda de massa obtida após aquecimento das amostras até 600 °C é apresentada na Tabela 3.3 e os termogramas obtidos na Figura 3.4.

Tabela 3.3 - Perda de massa do aerogel com e sem enzima imobilizada e da enzima livre

Amostra	Perda Região I (%)	Perda Região II (%)	Total Perda (%)
Aerogel sem enzima	11,25	4,01	15,26
Aerogel com enzima	71,20	3,36	74,56

O valor obtido para a perda de massa do aerogel sem lipase imobilizada foi de 15,26 %, sendo a maior perda de massa, com 11,25 %, observada na região I, possivelmente devido a água na superfície e nos poros com maior acessibilidade, cuja perda por evaporação ocorre em temperatura de até 200 °C. Para o aerogel imobilizado a perda de massa foi de 74,56 %, com a maior perda de massa, cerca de 71 %, também na região I.

Figura 3.4 - Curva termogravimétrica dos aerogéis com e sem a lipase CALB imobilizada



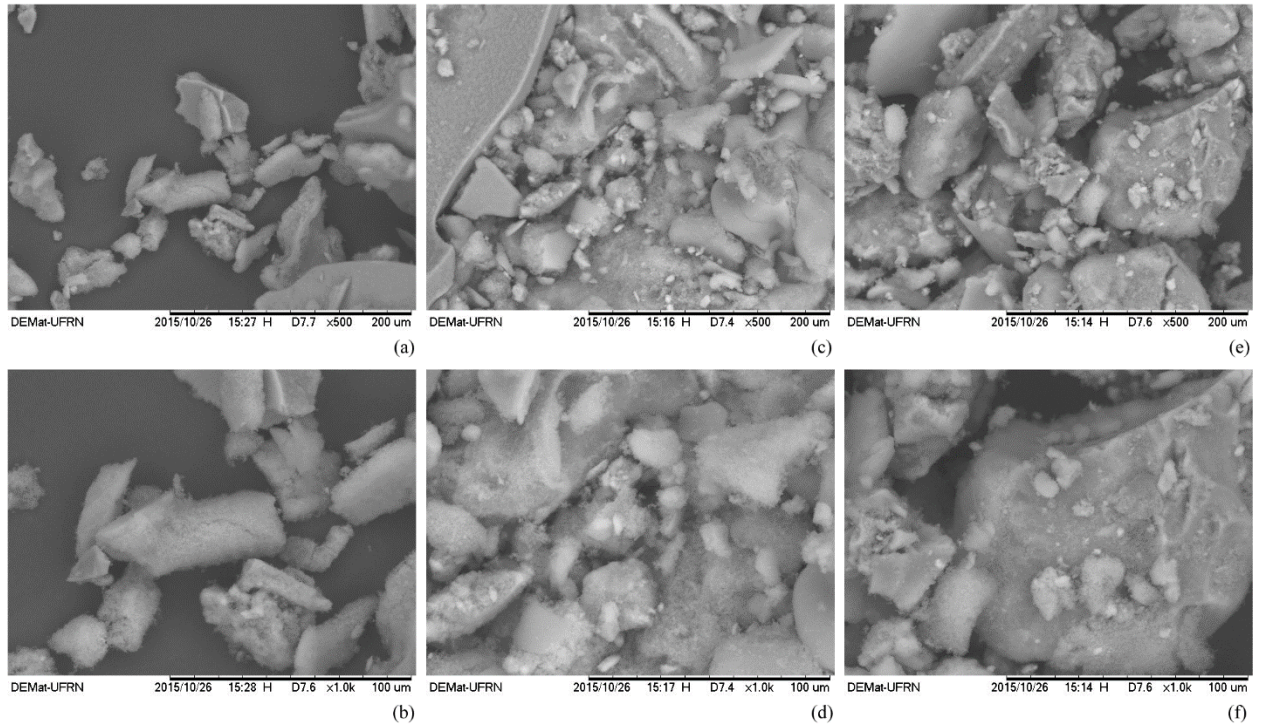
Observa-se que o aerogel sem lipase imobilizada apresenta uma perda de massa menor que o aerogel imobilizado com a lipase. Os termogramas foram divididos em duas regiões. Na Região I, na qual a temperatura é de aproximadamente 200 °C, ocorre a perda de peso associada principalmente com a desidratação, decomposição de grupos amino e, geralmente grupos orgânicos.

Na Região II (200 a 600 °C), a perda está associada com a condensação de grupos silanol e da perda de alguns componentes orgânicos (C, H, O e N) sob forma de compostos voláteis, incluindo a lipase e a presença de grupos silanois do precursor TEOS que não reagiram, presentes na sílica, devido à incompleta reação sol-gel (MUKHERJEE et al., 2009).

3.3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As morfologias dos aerogéis imobilizados obtidos nas diferentes condições de secagem, pode ser visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentadas na Figura 3.5.

Figura 3.5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do aerogel com ampliação de 500 vezes (a) (c) (e) e 1000 vezes (b) (d) (f)



(a) e (b) 80 bar e 40°C (c) e (d) 140 bar e 55°C; (e) e (f) 200 bar e 25°C

As micrografias MEV dos aerogéis secos em diferentes condições, mostram partículas com morfologias irregulares, sem forma definida, com tamanhos heterogêneos e inferiores a 200 μm . Estruturas típicas de suporte obtidas no processo sol-gel (TEWARI; HUNT; LOFFTUS, 1985)

3.3.2 Cinética de secagem do aerogel imobilizado

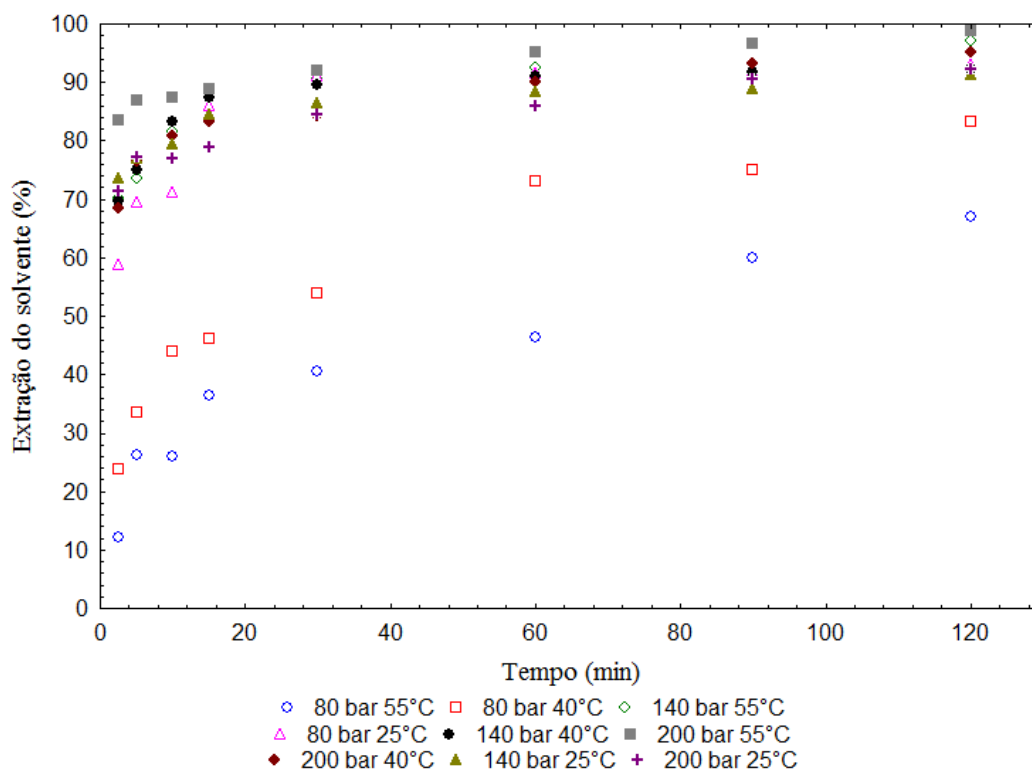
O estudo do tempo da secagem do gel por meio supercrítico é considerado como um dos pontos fundamentais a ser considerado para elaboração de materiais à base de aerogel para suas diversas aplicações. Normalmente na síntese de aerogel o tempo de secagem é estimado para que nenhum líquido esteja presente no gel seco. No entanto, para a imobilização da enzima, é

importante que permaneça no interior da sílica quantidade suficiente de água para a manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional das lipases.

Desta forma, o estudo da secagem como uma função de tempo é o primeiro procedimento a ser avaliado no efeito da imobilização sobre a atividade da enzima. Esta etapa irá fornecer informações fundamentais para a formação do aerogel imobilizado, tendo em vista a atividade enzimática e a quantidade de solvente extraído. Além disso, essa etapa irá permitir a otimização do processo, reduzindo o tempo operacional para obtenção do imobilizado em estudo.

A Figura 3.6 apresenta o efeito da pressão e da temperatura nos valores da massa extraída do aerogel imobilizado após a secagem com CO₂ em diferentes tempos.

Figura 3.6 – Cinética de extração do solvente após a secagem com CO₂ em diferentes pressões, temperaturas e tempo



Todas as condições avaliadas apresentaram uma mesma tendência, exibindo um aumento na porcentagem de massa extraída em função do tempo, com as principais diferenças entre as condições sendo observadas no início do processo, até os 20 minutos iniciais.

Os ensaios que empregaram menor pressão (80 bar), independentemente da temperatura, apresentaram os menores resultados de secagem. Este comportamento foi vinculado ao fato do aumento da pressão do sistema favorecer a difusão do CO₂ no interior dos poros do imobilizado, e consequentemente, ocorrendo a substituição do solvente, resultando na

sua extração. Essa substituição do solvente (álcool) pelo CO₂ no interior dos poros foi estudada por Tewari; Hunt; Lofftus (1985) os quais concluíram que esta substituição ocorre pelo fato do CO₂ possuir uma maior pressão e menor temperatura crítica do que os álcoois.

Em relação a porcentagem de massa extraída também se observa uma tendência com a densidade do gás, com as maiores densidades do gás foi possível observar as maiores extrações do solvente do suporte imobilizado. Esse comportamento deve-se as propriedades dos fluidos, que variam com a densidade, em função da temperatura e da pressão na região supercrítica.

Em relação ao tempo, os resultados são promissores em relação a literatura. Segundo Barbosa et al. (2016) o estudo de tempo de secagem na imobilização de *Burkholderia cepacia* em aerogel mostrou que para uma vazão de CO₂ constante de 2mL/min o tempo de 4 horas foi insuficiente para uma eficiente extração dos solventes do biocatalisador imobilizado.

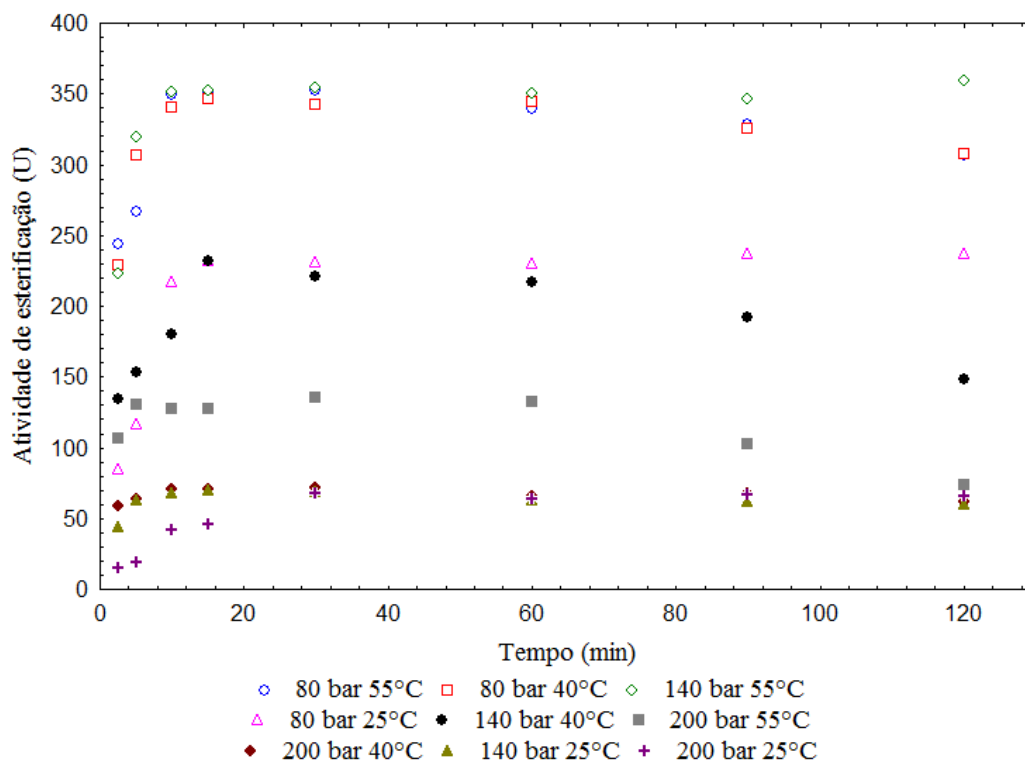
A atividade de esterificação (U) da sílica aerogel após a secagem com CO₂ em diferentes pressões, temperaturas e tempo está apresentada na Figura 3.7.

Para a atividade de esterificação observa-se a mesma tendência para todos os aerogéis imobilizados, com um aumento da atividade de esterificação em função do tempo até 30 minutos de secagem, mantendo-se constante até o término do experimento, ou seja, 120 minutos. Este comportamento deve-se a extração de solvente da estrutura do imobilizado, melhorando assim a difusibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, a atividade de esterificação.

Também se observa que as atividades são maiores quando os aerogéis foram secos nas menores densidades do gás (0,20 g/cm³, 0,29 g/cm³ e 0,57 g/cm³), as quais correspondem a pressão de 80 bar e temperaturas de 55 e 40 °C e 140 bar e temperatura de 55 °C.

Ao analisar de forma independente as variáveis estudadas, observa-se para a pressão, nas três temperaturas estudadas, um efeito negativo sobre a atividade de esterificação, com os ensaios conduzidos com a menor pressão (80 bar) apresentando os maiores valores de atividade. A tendência observada para a atividade é inversamente proporcional á perda de massa, os imobilizados com menor perda de massa apresentam as maiores atividades enzimáticas. Isto sugere que durante o processo de secagem, principalmente quando conduzido a alta pressão, esta arrastando concomitantemente com o solvente e parte da enzima presente na estrutura do imobilizado.

Figura 3.7 - Atividade de esterificação (U/g) da sílica aerogel após a secagem com CO₂ em diferentes pressões, temperaturas e tempo



Observa-se no teste de Tukey (Tabela 3.4) para as médias da AE que, ao analisar cada tempo de secagem, individualmente, as condições de pressões e temperaturas utilizadas se diferem com o aumento da densidade do CO₂.

Considerando a densidade, ambos os ensaios conduzidos com as menores (0,2 – 0,57 g/cm³) e a maiores (0,83 – 0,92 g/cm³) densidade apresentam a mesma tendência, com os valores de atividade de esterificação, para a maioria dos tempos estudados, não apresentando diferença estatística (Tukey) entre seus pares, porém, diferem em relação às outras faixas de densidade.

Para os ensaios conduzidos com valores de densidades intermediários, entre 0,72 g/cm³ e 0,73 g/cm³ observa-se para a maioria dos tempos estudados uma diferença estatística nos valores de atividade entre seus pares e em relação aos demais ensaios conduzidos com densidades nas demais regiões avaliadas.

De acordo com a literatura, o efeito da exposição aos fluidos pressurizados sobre a atividade enzimática não apresenta uma tendência padrão, com algumas enzimas apresenta tanto aumento quanto diminuição em suas atividades após tratamento em alta pressão, com algumas apresentando completa inativação (OLIVEIRA et al., 2006; FRICKS et al., 2006).

A redução da atividade enzimática pode ser atribuída as interações enzima-solvente durante o processo de secagem com CO₂ pressurizado (KNEZ; HABULIN, 2002). Segundo relatos da literatura, o CO₂ pressurizado seria responsável pela retirada da água, que é um composto essencial do microambiente da enzima para a manutenção da atividade enzimática, e dessa forma, causando a desativação da enzima (OLIVEIRA et al., 2006; FRICKS et al., 2006; PRIMO et al., 2007). Com o aumento da pressão e, conseqüentemente, da densidade do gás, esta interação é favorecida, contribuindo assim para uma maior perda de atividade (Figura 3.7).

Por outro lado, Maury et al. (2005) afirmam que este método de imobilização, que emprega com etapa de secagem à extração dos solventes com fluido supercrítico, ao evitar as contrações capilares do reticulado de sílica (SiO₂), tende a apresentar um efeito positivo sobre a atividade, quando comparadas com outras técnicas de secagem.

Tabela 3.4 - Teste de Tukey para a atividade de esterificação do aerogel imobilizado após secagem com CO₂ em diferentes condições de secagem de pressão e temperatura (letras maiúsculas nas linhas) e tempos de secagem (letras minúsculas nas colunas)

Condição de secagem	Tempo (min)/ Densidade (g/cm ³)	2,5	5	10	15	30	60	90	120
80 bar e 55°C	0,20932	244,16 ± 11,10 ^{Ac}	266,79 ± 28,38 ^{Bbc}	349,26 ± 10,91 ^{Aa}	351,64 ± 17,29 ^{Aa}	352,45 ± 27,11 ^{Aa}	339,78 ± 5,76 ^{Aa}	328,60 ± 22,66 ^{Aa}	306,82 ± 34,09 ^{Aab}
80 bar e 40°C	0,28477	229,07 ± 6,84 ^{Ad}	306,20 ± 6,71 ^{Ac}	340,38 ± 11,74 ^{Aab}	345,92 ± 5,86 ^{Aa}	342,88 ± 6,02 ^{Aab}	344,25 ± 11,87 ^{Aab}	325,26 ± 7,13 ^{Abc}	307,35 ± 6,74 ^{ABc}
140 bar e 55°C	0,57443	223,34 ± 16,34 ^{Ab}	319,77 ± 5,81 ^{Aa}	351,26 ± 22,66 ^{Aa}	352,63 ± 48,64 ^{Aa}	353,91 ± 2,92 ^{Aa}	350,00 ± 60,34 ^{Aa}	346,84 ± 5,88 ^{Aa}	359,06 ± 6,09 ^{Aa}
80 bar e 25°C	0,72073	84,46 ± 12,07 ^{CDa}	116,42 ± 30,64 ^{Da}	217,39 ± 48,31 ^{Bb}	231,48 ± 11,57 ^{Bb}	230,84 ± 5,77 ^{Bb}	230,17 ± 5,90 ^{Bb}	237,19 ± 83,02 ^{Bb}	236,65 ± 54,61 ^{Bb}
140 bar e 40°C	0,7265	134,28 ± 33,23 ^{Bc}	153,19 ± 6,13 ^{Cbc}	180,49 ± 6,65 ^{Bac}	232,37 ± 13,88 ^{Ba}	221,17 ± 6,84 ^{Bab}	216,65 ± 26,80 ^{Ba}	192,31 ± 24,04 ^{Bac}	148,24 ± 45,50 ^{Cc}
200 bar e 55°C	0,73086	106,13 ± 11,79 ^{BCb}	130,08 ± 7,04 ^{CDa}	127,92 ± 6,09 ^{Ca}	127,80 ± 6,09 ^{Ca}	135,47 ± 6,16 ^{Ca}	132,50 ± 6,02 ^{Ca}	102,56 ± 11,40 ^{Cb}	73,93 ± 5,69 ^{Dc}
200 bar e 40°C	0,8309	59,24 ± 20,52 ^{Da}	63,95 ± 5,81 ^{Ea}	70,42 ± 11,74 ^{Da}	70,36 ± 11,73 ^{Da}	72,18 ± 12,03 ^{Da}	65,29 ± 5,94 ^{Da}	67,93 ± 6,18 ^{Ca}	62,25 ± 17,83 ^{Da}
140 bar e 25°C	0,85402	44,03 ± 20,80 ^{DEa}	62,52 ± 6,05 ^{Ea}	67,72 ± 11,95 ^{Da}	70,20 ± 12,39 ^{Da}	68,70 ± 12,12 ^{Da}	62,64 ± 6,06 ^{Da}	61,74 ± 5,98 ^{Ca}	60,21 ± 18,40 ^{Da}
200 bar e 25°C	0,92319	15,46 ± 6,70 ^{Ed}	19,10 ± 6,62 ^{Fcd}	41,99 ± 6,61 ^{Dbc}	46,16 ± 11,54 ^{Dab}	67,79 ± 11,30 ^{Da}	64,09 ± 13,06 ^{Dab}	66,30 ± 13,51 ^{Ca}	65,40 ± 6,66 ^{Dab}

Médias e desvio padrão da atividade de esterificação do aerogel imobilizado seguidos por letras iguais não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Maiúsculas nas colunas (tempo de secagem) e minúsculas nas linhas (condições de ensaio)

Neste sentido, a estabilidade da enzima em CO₂ supercrítico depende tanto de sua estrutura terciária quanto de outros parâmetros, como a exposição a altas pressões e temperatura do CO₂ durante o processo, que podem inativar a enzima (STEINBERGER; GAMSE; MAAR, 1999).

Para o tempo de secagem observa-se, para a maioria das diferentes condições de ensaio, que não há diferença estatística (Tukey) entre as médias das atividades de esterificação após 30 min de secagem, desta forma, optou-se por definir este tempo para o processo de obtenção do aerogel imobilizado.

A partir dos resultados obtidos, manteve-se constante o tempo em 30 min de secagem para as diferentes condições de pressão e temperatura e fez-se o tratamento estatístico para determinar a tendência da secagem da CALB imobilizada na sílica aerogel.

A matriz dos experimentos e as respostas atividade de esterificação e rendimento de imobilização são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Atividade de esterificação e rendimento da enzima lipase CALB imobilizada em sílica aerogel para o planejamento fatorial 3²

Ensaio	Densidade do CO ₂			AE (U/g) ± σ	R (%) ± σ
	X ₁	X ₂	(g/cm ³)		
1	-1 (25)	-1 (80)	0,7207	230,84 ± 5,77 ^b	218,65 ± 4,46 ^d
2	-1 (25)	0 (140)	0,8540	68,70 ± 12,12 ^d	64,21 ± 9,25 ^f
3	-1 (25)	+1 (200)	0,9232	67,79 ± 11,30 ^d	72,41 ± 9,85 ^f
4	+1 (40)	-1 (80)	0,2848	342,88 ± 6,02 ^a	666,69 ± 9,55 ^b
5	0 (40)	0 (140)	0,7265	221,17 ± 6,84 ^b	243,46 ± 30,74 ^d
6	0 (40)	+1 (200)	0,8309	72,18 ± 12,03 ^d	60,99 ± 8,29 ^f
7	0 (55)	-1 (80)	0,2093	352,45 ± 27,11 ^a	871,79 ± 54,75 ^a
8	+1 (55)	0 (140)	0,5744	353,91 ± 2,92 ^a	338,61 ± 2,28 ^c
9	+1 (55)	+1 (200)	0,7309	135,47 ± 6,16 ^c	132,09 ± 4,90 ^e

X₁: Valores codificados e reais para temperatura (°C); X₂: Valores codificados e reais para pressão (bar); AE: Atividade de Esterificação; R: Rendimento. Médias ± desvio padrão da atividade de esterificação do aerogel imobilizado seguidos por letras iguais na coluna não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Para a temperatura, seu aumento proporciona uma melhora tanto na atividade de esterificação quanto no rendimento de imobilização, enquanto que para a pressão, seu aumento conduz a redução de ambas as respostas.

O aumento da pressão ao facilitar a substituição do solvente pelo CO₂ (KNEZ; HABULIN, 2002), além de tornar a etapa de secagem mais eficiente, amplia a possibilidade de

lixiviação de enzima do suporte, o que justificaria tanto a perda de atividade quanto de rendimento de imobilização.

Outra tendência observada é o aumento da atividade de esterificação e do rendimento de imobilização com a diminuição da densidade do gás, com o ensaio (sete) conduzido com a menor densidade (0,2093) apresentando os maiores valores de atividade de esterificação (352,45 U/g) e rendimento de imobilização (871,79 %).

Cabe destacar que ambas as tendências observadas para as variáveis temperatura e pressão, em relação as respostas acompanhadas, exibem uma relação direta com a variação dos valores de densidade do gás observados entre os ensaios, o qual tende a aumentar com a diminuição da pressão e o aumento da temperatura.

Os modelos (Equações 3.7 e 3.8) foram validados pela análise de variância (ANOVA) para ambas variáveis estudadas, na qual mostrou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,86 e 0,79 para AE e rendimento, respectivamente. Além disso, apresentou um bom desempenho do F-teste (valor calculado 75,85 e 47,00 respectivamente para AE e rendimento) maior que o F_{tabelado} (3,40).

$$AE (U) = 205,27 + 79,42x_1 - 108,11x_2 \quad (3.7)$$

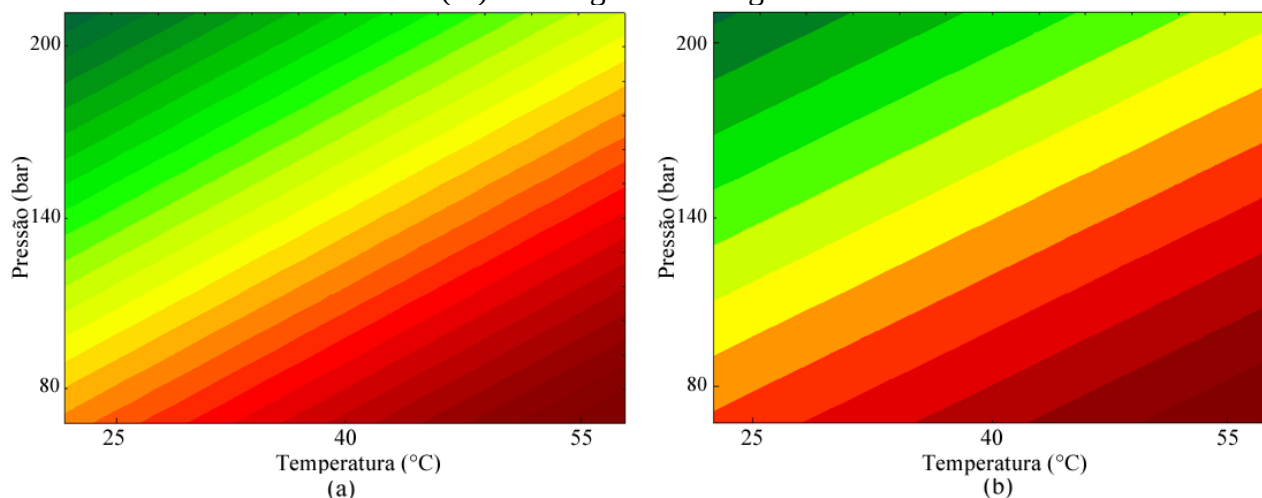
$$R (\%) = 296,77 + 164,87x_1 - 248,27x_2 \quad (3.8)$$

Os coeficientes de regressão dos fatores temperatura e pressão avaliados para a atividade de esterificação e rendimento, indicando um efeito linear positivo para a variável temperatura e um efeito linear negativo para pressão sobre ambas as respostas avaliadas, corroborando com a tendência observada anteriormente.

A superfície de resposta e a curva de contorno relacionado a interação entre as variáveis pressão e temperatura para ambas as respostas se encontram apresentadas na Figura 3.8.

Observa-se nas curvas de contorno, para ambas respostas, que a tendência para as maiores atividades de esterificação (a) e rendimento (b) encontram-se na região de maiores temperaturas e menores pressões, ou seja, nas condições de menor densidade estudadas.

Figura 3.8 - Curvas de contorno para o planejamento fatorial 3^2 em relação a AE (U/g) e R (%) na secagem do aerogel



- (a) curva de contorno para a atividade de esterificação em relação à pressão e temperatura na secagem do aerogel;
 (b) curva de contorno para o rendimento em relação a pressão e temperatura na secagem do aerogel.

Devido as médias de atividades de esterificação nas condições de menor densidade de secagem (80 bar e 55°C, 80 bar e 40°C e 140 bar e 55°C) não apresentarem diferença significativa entre si ao nível de 5 % (Teste de Tukey, Tabela 3.5) para a atividade de esterificação, optou-se, para as etapas seguintes testar a estabilidade (operacionais, térmica e de estocagem) dos aerogéis imobilizados nessas condições.

3.3.3 Estabilidade de estocagem

As Figuras 3.9 e 3.10 descrevem o comportamento da atividade residual (AR) de esterificação para os aerogéis imobilizados, armazenados a temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente.

Independente da condição de secagem a enzima imobilizada no aerogel, apresentou um maior tempo de estocagem quando comparado com a enzima livre. Em relação à condição de secagem, os aerogéis imobilizados apresentaram comportamento semelhante, com uma AR superior a 50% por 165 dias de armazenamento em temperatura ambiente e superior a 260 dias em refrigeração. Entre as condições de estocagem as amostras armazenadas em refrigeração, com 260 dias, apresentaram um desempenho 60% superior ao observado para a temperatura ambiente, com 165 dias com atividade residual superior a 50%.

A estabilidade de estocagem por longos períodos é um dos principais fatores a serem considerado quando se utiliza lipases imobilizadas. Estes resultados demonstram que um fator importante é a forma como os aerogéis são estocados.

Figura 3.9 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em temperatura ambiente da CALB livre e imobilizada em sílica aerogel nas diferentes condições de secagem

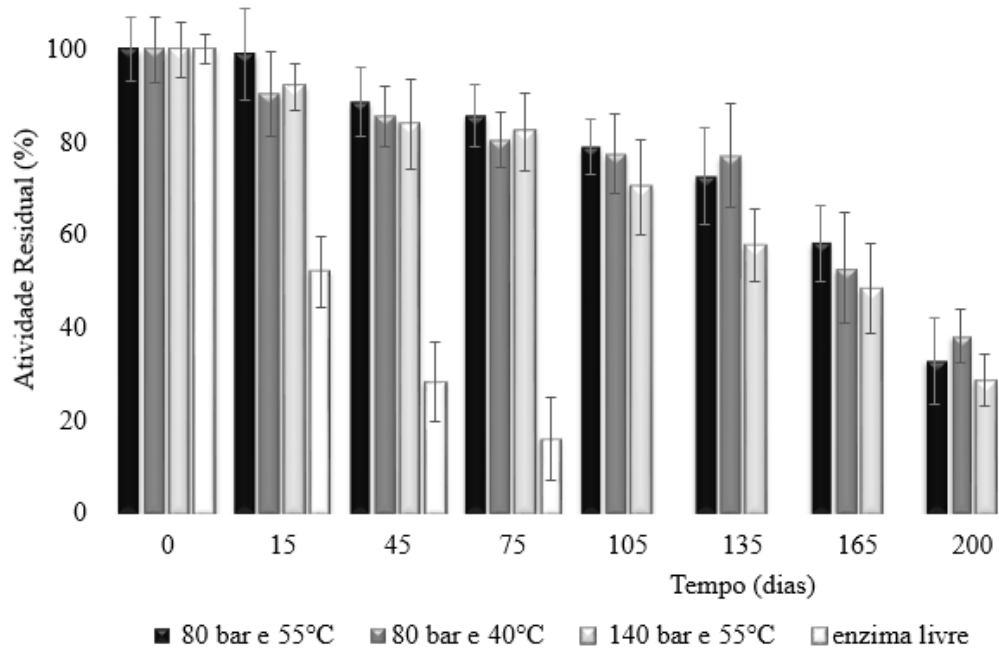
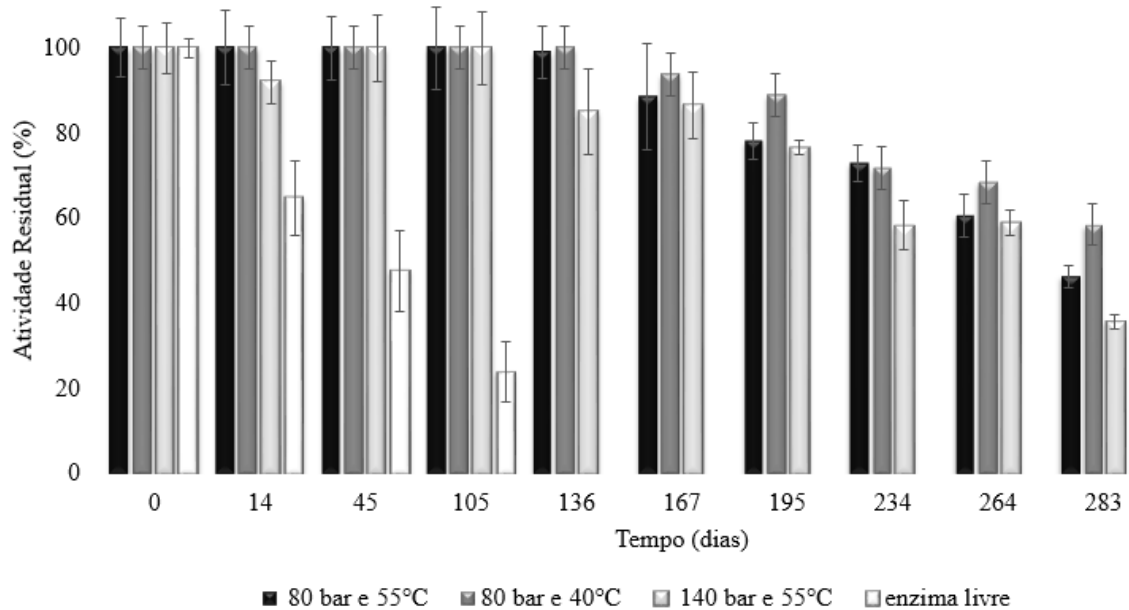


Figura 3.10 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em refrigeração da CALB livre e imobilizada em sílica aerogel nas diferentes condições de secagem



Estudos da estabilidade de estocagem realizados por Ficanha et al. (2015) apresentaram um comportamento semelhante na estabilidade de estocagem armazenados em temperatura ambiente para CALB imobilizada em xerogel. Cabe destacar que os resultados obtidos para estocagem do aerogel (independente da forma de estocagem) apresentou tempos maiores do

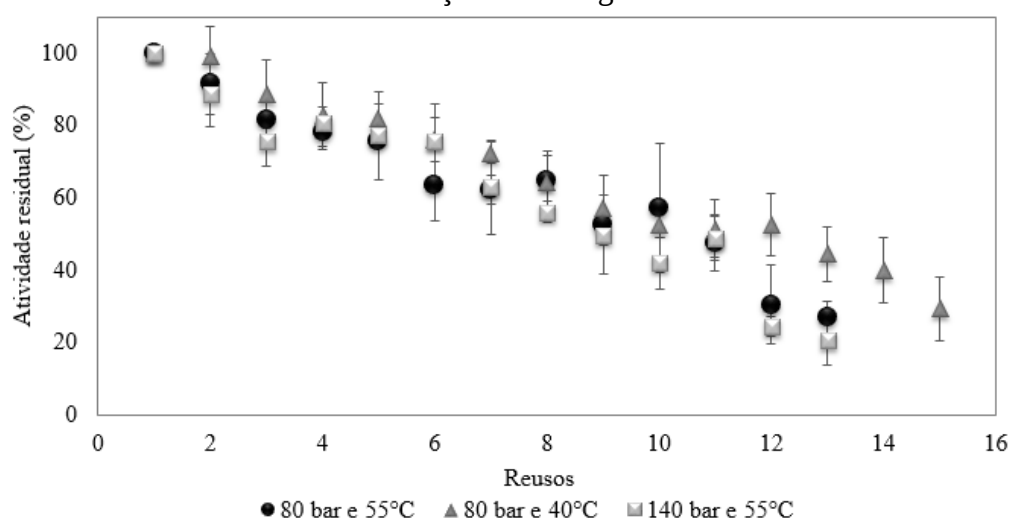
que os descritos na literatura para xerogéis (SOARES et al., 2006; YILMAZ; SEZGIN; YILMAZ, 2011).

Este comportamento foi vinculado a estabilidade proporcionada pela maior porosidade dos aerogéis, a qual atua protegendo a conformação tridimensional da lipase imobilizada e o local ativo de qualquer alteração estrutural que podem afetar a sua atividade catalítica (KHARRAT et al., 2011).

3.3.4 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional do aerogel imobilizado foi verificada em reações de esterificação em regime de bateladas consecutivas com a reutilização do imobilizado. Os resultados obtidos para a estabilidade operacional podem ser visualizados na Figura 3.11.

Figura 3.11 - Estabilidade operacional da CALB imobilizada em sílica aerogel nas diferentes condições de secagem



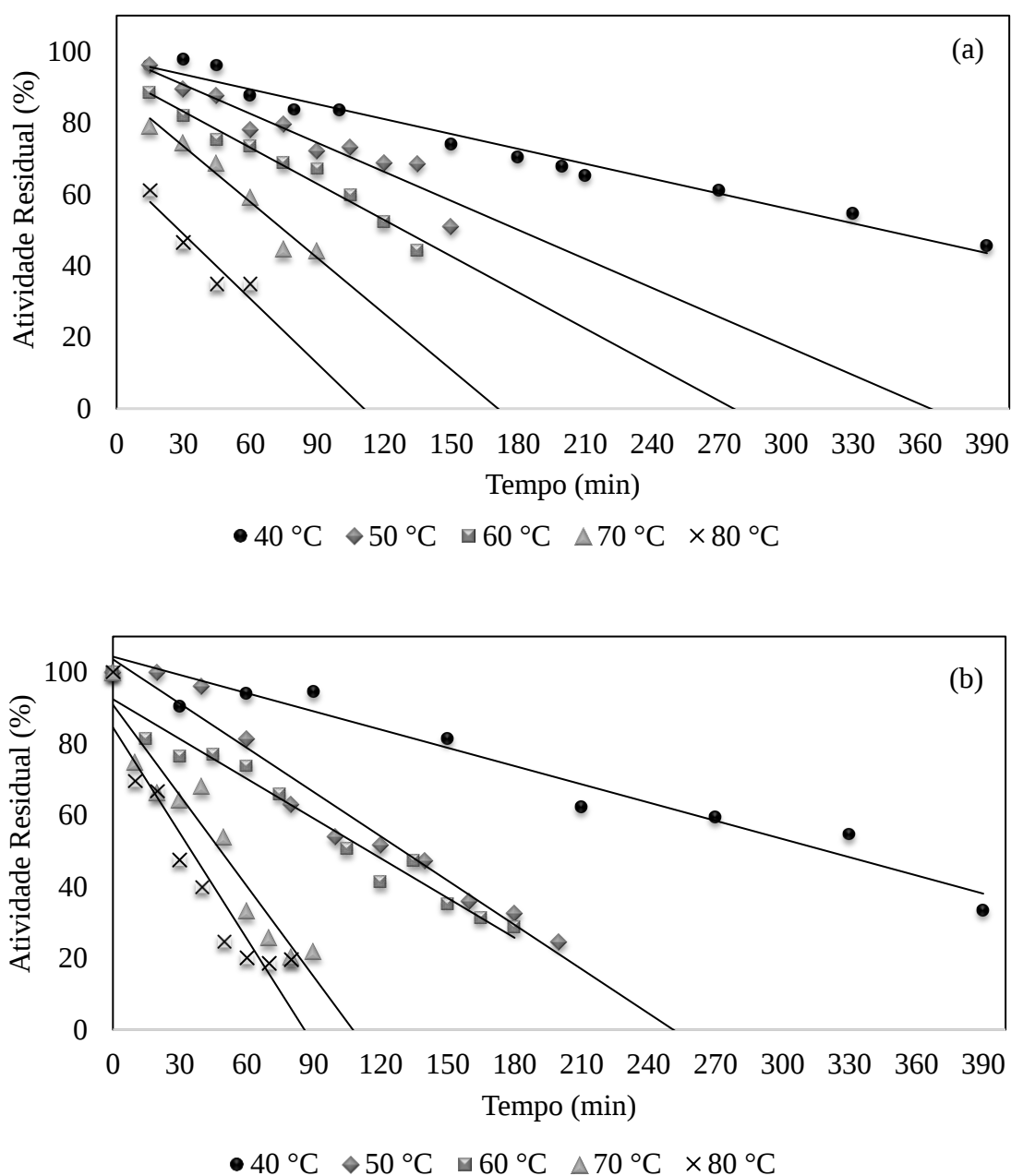
Todos os aerogéis imobilizados apresentaram um comportamento semelhante, com um declínio contínuo da atividade residual entre os ciclos, apresentando entre 8 e 12 ciclos com atividade residual superior a 50%. Esta tendência foi vinculada a lixiviação da enzima do suporte, uma vez que a mesma, ao ser incorporada, permanece somente confinada na estrutura do suporte (e não quimicamente ligada), favorecendo assim sua lixiviação.

Em comparação ao número de reuso obtido, resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos desenvolvidos por Maury et al. (2005) e Orçaire; Buisson; Pierre, (2006) que observaram que a atividade catalítica da enzima decresce para aproximadamente 60% após 11 reusos.

3.3.5 Estabilidade térmica

Devido o comportamento semelhante dos três aerogéis para estabilidade de estocagem e reciclo, optou-se por realizar a estabilidade térmica na condição de 80 bar e 40°C, que demonstrou resultados melhores que os outros aerogéis imobilizados. A estabilidade das lipases livre e imobilizada foi avaliada nas temperaturas de 40 °C a 80 °C, sendo o perfil gráfico apresentado na Figura 3.12.

Figura 3.12 - Estabilidade térmica a 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C da lipase CALB livre (a) e imobilizada (b)



Para ambas as lipases (livre e imobilizada) a menor perda de atividade em função do tempo, ou seja, melhor estabilidade térmica, foi observada para a menor temperatura empregada neste estudo (40 °C). Também se observa que a estabilidade térmica varia inversamente com a temperatura, com a temperatura de 80 °C apresentando, para ambas as lipases, em 45 min de estocagem aproximadamente 20% de sua atividade residual, ou seja, o pior desempenho dentre as temperaturas avaliadas.

A estabilidade térmica foi também avaliada através do cálculo da constante de desativação térmica (k_d) e do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB livre e imobilizada em aerogel (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Constante desativação térmica (K_d), os coeficientes de determinação (R^2) e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB livre e imobilizada

Temperatura (°C)	CALB livre			Imobilizada em aerogel		
	K_d (h ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (h)
40	0,12	0,89	5,79	0,12	0,93	6,02
50	0,34	0,91	2,07	0,20	0,93	3,39
60	0,42	0,89	1,66	0,32	0,96	2,17
70	1,06	0,94	0,65	0,57	0,95	1,21
80	1,48	0,96	0,47	1,26	0,88	0,55

Com exceção da temperatura de 40°C, todas as demais condições apresentaram para a lipase imobilizada valores de K_d menores e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) maiores aos obtidos para a enzima livre. Ambos resultados sugerem que a estabilidade térmica da enzima imobilizada é maior do que a da enzima livre, sugerindo que o suporte em questão atua protegendo a enzima dos efeitos negativos da temperatura em relação a sua conformação ativa (YANG et al., 2010; ZUBIOLO et al., 2014), possibilitando seu emprego em processos que requerem maiores temperaturas.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta para viabilizar a utilização das enzimas, pois permite a sua reutilização e pode reduzir significativamente a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para o setor industrial, pois para que a aplicação de enzimas no setor industrial seja viável é necessário obter biocatalisadores ativos e estáveis termicamente (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005).

3.4 Considerações Parciais

O estudo do tempo, pressão e temperatura para a secagem da sílica aerogel com a lipase de *Candida antarctica* B imobilizada *in situ* é uma etapa importante e pouco estudada para a imobilização de enzima em aerogel. Em relação ao tempo, os resultados são promissores em relação a literatura. A partir dos resultados obtidos, foi definido como melhor tempo de secagem 30 min. Foi verificado, também a tendência para máximas atividades de esterificação, confirmada pelo planejamento fatorial, em menores pressões e maiores temperaturas (condições de menor densidade do gás). A tendência observada para a atividade de esterificação é inversamente proporcional a extração de massa, pois, durante a o processo de secagem, pode estar sendo arrastada concomitantemente com o solvente.

A partir desses resultados, foram realizados testes para verificar a estabilidade de estocagem, térmica e operacional. O processo de imobilização proporcionou um aumento da estabilidade térmica, de estocagem e operacional em relação à enzima livre. A estabilidade de estocagem por longos períodos é um dos principais fatores a ser considerado quando se utiliza lipases imobilizadas, estes resultados demonstram que um fator importante é a forma como os aerogéis são estocados, apresentando maior atividade residual quando armazenados sob refrigeração. Por outro lado, independente da condição de armazenagem, os aerogéis apresentaram maior tempo de estocagem quando comparado com a enzima livre.

Em relação à estabilidade operacional os resultados demonstraram a possível reutilização dos aerogéis imobilizados (entre 8 e 12 ciclos), comprovando a eficiência do método empregado para a imobilização, sendo esta uma das principais vantagens sobre a enzima livre. Para a estabilidade térmica, nas temperaturas acima de 50°C, as lipases imobilizadas em aerogel apresentaram para a lipase imobilizada valores de K_d menores e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) maiores aos obtidos para a enzima livre o que demonstra a estabilidade térmica da enzima imobilizada maior do que a da enzima livre, sugerindo que o

suporte em questão atua protegendo a enzima dos efeitos negativos da temperatura, possibilitando seu emprego em processos que requerem maiores temperaturas.

A contribuição deste trabalho foi apresentar uma redução no tempo e das condições de secagem no processo de imobilização em aerogel. Além do processo de imobilização ser realizado *in situ* no qual não necessita de etapas posteriores após a secagem do aerogel. O aerogel imobilizado obtido pode substituir processos químicos convencionais em aplicações industriais devido aos bons resultados apresentados para a estabilidade térmica e operacional.

.

3.5 Referências Bibliográficas

- AEGERTER, M. A.; LEVENTIS, N.; KOEBEL, M. M. **Advances in Sol-Gel Derived Materials and Technologies**, Springer New York, 2011.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 512-523, 2012.
- BARBOSA, A. S. et al. The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. **Química Nova**, v. 39, p. 415-422, 2016.
- BRADY, D.; JORNDAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639-1650, 2009.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.
- CUCE, E. et al. Toward aerogel based thermal superinsulation in buildings: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.34, p. 273-299, 2014.
- DORCHEH, A. S.; ABBASI, M. H. Silica aerogel; synthesis, properties and characterization. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 199, p. 10-26, 2008.
- FICANHA, A. M. M. et al. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v. 38, p. 364-369, 2015.
- FRICKS, A. T. et al. Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 347-353, 2006.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A. et al. Supercritical drying of aerogel using CO₂: Effect of extraction time on the end material textural properties. **Supercritical Fluids**, v. 66, p. 297-306, 2012.
- GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface area and Porosity**. Academic Press: London, 1982.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HENCH, L. L. et al. Sol-gel processing of large silica optics. **Ultrastructure processing of advanced materials**. UHLMANN, D. R.; ULRICH, D. R. Wiley, New York, 1992.
- HÜSING, N.; SCHUBERT, U. Aerogels-airy materials: chemistry, structure and properties. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 110, p. 22-47, 1998.
- JAFARIZADEH, M. A.; JAHANIAN, G.; BERENJIAN, A. Potential applications of chitosan nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, p. 203-219, 2012.
- KHARRAT, N. et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1083-1089, 2011.

- KNEZ, Z.; HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 23, p. 29-42, 2002.
- KUMAR, V. et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on magnetic Fe₃O₄-chitosan beads and its potential in phenolic acids ester synthesis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 787-795, 2013.
- MAURY, S. et al. Compared esterification kinetics of the lipase from *Burkholderia cepacia* either free or encapsulated in a silica aerogel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 193-203, 2005.
- MUKHERJEE, I. et al. Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous silica nanosphere. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 122, p. 168-174, 2009.
- NASSREDDINE, S. et al. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. **Journal Applied Catalysis A: General**, v. 344, p. 70-77, 2008.
- OLIVEIRA, D. et al. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 373-382, 2006.
- ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A. C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 106-113, 2006.
- PRIMO, M. S. et al. Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 283-290, 2007.
- SCHWERTFEGER, F.; FRANK, D.; SCHMIDT, M. Applications for Silica Aerogels Products. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 225, p. 24-29, 1998.
- SOARES, C. M. F. et al. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 69-76, 2006.
- SOUZA, R. L. et al. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 152-159, 2012.
- STEINBERGER, D. J.; GAMSE, T.; MAAR, R. Enzyme inactivation and prepurification effects of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). **Fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications**, CISF 99, p. 339, Verona, Italy, 1999.
- TEWARI, P. H.; HUNT A. J.; LOFFTUS, K. D. Ambient-temperature supercritical drying of transparent silica aerogel. **Materials Letters**, v. 3, p. 363-367, 1985.
- WU Y. et al. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3459-3464, 2009.
- YANG, G. et al. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated aminosilica gel via different methods. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 351-35, 2010.

- YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.69, p. 35-41, 2011.
- ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, p. 4503-4513, 2015.
- ZUBIOLO, C. et al. Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1781-1788, 2014.

4 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CALB EM AEROGEL E XEROGEL COM O USO DE PEG COMO ADITIVO

Neste capítulo será apresentada uma breve fundamentação teórica sobre o polietilenoglicol (PEG) utilizado como aditivo na imobilização enzimática, a metodologia e os resultados obtidos para o uso de PEG como aditivo na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel.

4.1 Fundamentação Teórica

As diferentes possibilidades de aplicações de enzimas estão aumentando continuamente, especialmente durante as duas últimas décadas (HOMAEI et al., 2013). No entanto, a instabilidade enzimática pode causar problemas na sua aplicação e aumentar o custo dos processos em que são utilizadas (STEPANKOVA et al., 2013; KHANAHMADI et al., 2015). Desta forma, a imobilização enzimática em suportes sólidos é um método para melhorar o desempenho enzimático, como estabilidade, atividade e seletividade durante processos biotecnológicos (RODRIGUES et al., 2013).

Neste sentido, a imobilização pode melhorar a rigidez estrutural da proteína e a estabilização da enzima, o que evita a inativação e torna a enzima mais estável no meio reacional. Também permite a reutilização da enzima durante um período prolongado de tempo e permite uma separação mais fácil dos catalisadores e do produto (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; GUZIK, HUPERT; WOJCIESZYNSKA, 2014).

Entre os diferentes suportes utilizados para a imobilização enzimática, encontram-se aqueles que podem ser imobilizados *in situ*, com ou sem ligações, durante a fase de síntese de suporte. Desta forma, o processo sol-gel (BRINKER; SCHERER, 1990) proporciona uma via sintética compatível para imobilização de células em matrizes de sílica inorgânica e que apresentam boa estabilidade mecânica e química. Devido a isto, a técnica sol-gel foi explorada e é frequentemente utilizada para a preparação de uma matriz híbrida na qual a enzima é retida dentro da matriz e forma uma reticulação tridimensional (SOARES et al., 2006; KIM et al., 2006).

Contudo, a técnica sol-gel apresenta algumas desvantagens resultantes do processo de imobilização (GUPTA; CHAUDHURY, 2007), como o acesso difícil do substrato ao local onde encontra-se a enzima imobilizada, que pode ser atribuído à estrutura porosa, bem como a

inativação ou desnaturação da enzima durante o processo de imobilização. Uma alternativa para superar estas desvantagens é a utilização de aditivos (SOARES et al., 2006; HARA et al., 2010; SOUZA et al., 2014).

Jin e Brennan (2002) demonstraram que, para melhorar a atividade de enzimas imobilizadas em sílica os aditivos podem ser introduzidos no processo sol-gel com o objetivo de proteger as enzimas dos efeitos desnaturantes formando uma proteção entre a proteína e o meio reacional.

A utilização de macromoléculas, tais como o polietilenoglicol (PEG) no processo de imobilização enzimática, proporciona uma melhor distribuição da enzima na superfície do suporte, permitindo um melhor contato entre a interface água/óleo, favorecendo as condições necessárias para a atividade enzimática da lipase imobilizada (SOARES et al., 2006; MOHIDEM; MAT, 2012).

Portanto, o objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar o efeito da utilização do aditivo PEG no processo de imobilização da lipase comercial de *Candida antarctica* B (CALB) em xerogel e aerogel obtidos pela técnica sol-gel.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Enzima e produtos químicos

A lipase commercial *Candida antarctica* (CALB) foi obtida da Novozyme (Bagsvaerd, Denmark). Os produtos químicos utilizados para a síntese de sol-gel foram tetraetilortosilicato (TEOS Sigma-Aldrich) como precursor da sílica, hidróxido de amônio (Quimex), ácido bromídrico (Vetec) como catalisador, polietileno glicol (PEG 1500) (Merck) como agente estabilizante (aditivo) e água destilada. Para determinação da atividade de esterificação foram utilizados etanol (Merck), acetona (Merck) e hidróxido de sódio (Synth). Os substratos utilizados na reação de esterificação foram ácido oleico (Aldrich) e etanol (Merck).

4.2.2 Síntese da sílica e imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel

A lipase de *Candida antarctica* (CALB) foi imobilizada em xerogel obtida pela técnica de sol-gel com o uso do tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor da sílica, seguindo metodologia descrita na literatura (FICANHA et al., 2015). Inicialmente, 5 mL de TEOS foram dissolvidos em 5 mL de etanol absoluto. Após a dissolução, adicionou-se 1,6 mL de água

destilada e três gotas do iniciador da reação de polimerização ácido bromídrico (HBr). Posteriormente, os sistemas reacionais foram submetidos a um agitador orbital (shaker) a 40 °C, 180 rpm, por um período de 90 min. Em seguida, fez-se a adição de 1 mL da solução do aditivo PEG e da solução enzimática e, por último, foram adicionados 1,75 mL da solução hidrolisante (solução etanólica de hidróxido de amônio 1,0 mol/L). Posteriormente, os sistemas reacionais foram mantidos em condições estáticas, em temperatura entre 20 °C e 25 °C, por 24 h para completar a condensação química.

Para obtenção do xerogel, após as 24 h, o suporte foi colocado em dessecador a vácuo (temperatura ambiente) por um período de 24 h para completar a secagem por evaporação. Após a secagem em condições brandas de temperatura e pressão obteve-se a lipase imobilizada na sílica, denominada de xerogel imobilizado.

Para a obtenção do aerogel, após as 24 h, o suporte foi submetido nas condições de pressão de 80 bar, temperatura de 40 °C por um tempo de 30 min (condições definidas nos experimentos do capítulo anterior), para completar a secagem pela extração do solvente. Após a secagem em condições supercrítica do CO₂, obteve-se a lipase imobilizada na sílica, denominada de aerogel imobilizado.

4.2.3 Determinações analíticas

As determinações analíticas utilizadas nesta etapa do trabalho são as descritas no capítulo anterior, item 3.2.4.

4.2.4 Influência da massa de enzima e aditivo PEG na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel

Testes preliminares foram realizados empregando diferentes concentrações de enzima e aditivo na etapa de imobilização para avaliar suas influências na atividade de esterificação e do rendimento da lipase CALB imobilizada. Os valores das variáveis tiveram como base estudos realizados anteriormente (FICANHA et al., 2015).

Primeiramente, a concentração da enzima foi fixada em 0,10 g/mL e a concentração do aditivo foi variada de 0,05 a 0,3 g/mL. Da mesma forma, foram realizados ensaios para avaliar a influência da enzima: a concentração do aditivo foi fixada em 0,05 g/mL e as concentrações de enzima foram variadas (0,05-0,2 g/mL).

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 completo foi proposto para otimizar as variáveis estudadas e obter máxima atividade de esterificação no xerogel e no aerogel imobilizado. Os valores das variáveis utilizados no DCCR são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Variáveis reais e codificadas testadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel

Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
X ₁	0,0295	0,05	0,10	0,15	0,1705
X ₂	0,059	0,10	0,20	0,30	0,341

X₁: enzima (g/mL); X₂: aditivo (g/mL)

Os níveis ótimos de enzima e aditivo foram confirmados mediante experimentos em triplicata, realizados nas condições ótimas descritas pelo modelo estatístico. Após a confirmação, realizou-se os testes de estabilidade operacional e de armazenagem dos xerogéis e aerogéis otimizados.

A análise estatística relacionada com a estimativa dos efeitos de cada uma das variáveis foi realizada utilizando o erro puro e o desvio padrão relativo entre os dados experimentais e previstos, os quais, foram realizadas considerando um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

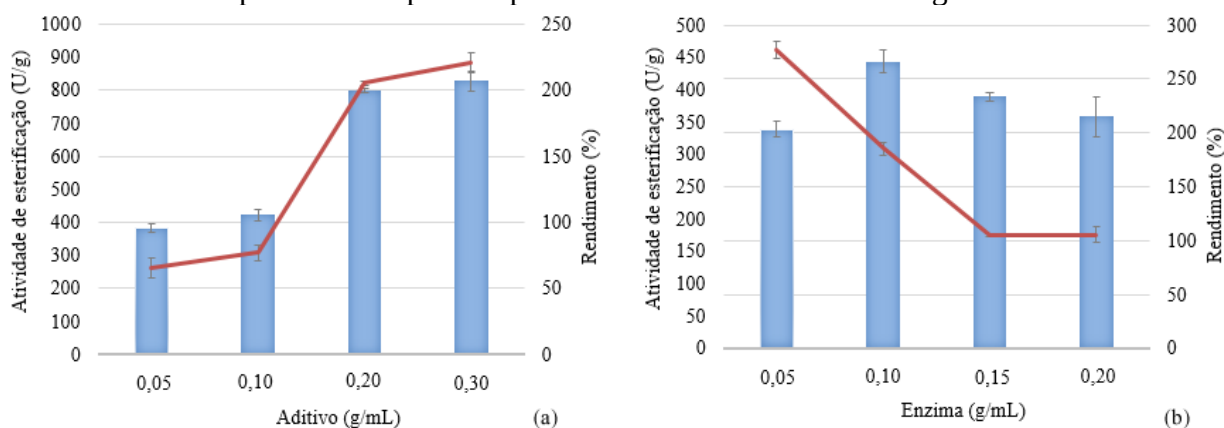
4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Influência de massas de enzima e aditivo na atividade de esterificação

A Figura 4.1 apresenta a atividade de esterificação e rendimento obtidos nos testes preliminares para as diferentes massas de enzima e aditivo testado na imobilização da lipase CALB em xerogel.

Para a variação da concentração de aditivo (concentração da enzima fixa em 0,10 g/mL) (Figura 4.1 (a)) observa-se um efeito positivo do aditivo, proporcionando um aumento da atividade de esterificação de $\cong 400$ U/g (observado para 0,05 e 0,1 g/mL) para $\cong 800$ U/g, observado para 0,20 e 0,30 g/mL. A mesma tendência é observada para a resposta rendimento, o que já era esperado em virtude de a mesma considerar em seus cálculos a atividade inicial oferecida, a qual foi igual em todos os ensaios. Partindo-se da mesma atividade oferecida o rendimento tende a variar proporcionalmente com a atividade de esterificação.

Figura 4.1 - Atividade de esterificação (colunas) e rendimento (linhas) obtidos nos testes preliminares para a lipase CALB imobilizada em xerogel



(a) concentração da enzima fixa em 0,10 g/mL; (b) concentração de aditivo fixa em 0,05 g/mL

Para a variação da concentração de enzima, quando a concentração do aditivo foi fixada (0,05 g/mL) (Figura 4.1 (b)) o comportamento muda, apresentando um aumento da atividade de esterificação quando a concentração da enzima passa de 0,05 ($\cong 350$ U/g) para 0,10 g/mL ($\cong 450$ U/g), seguido de uma diminuição contínua da AE até a concentração de 0,20 g/mL ($\cong 375$ U/g).

Em relação ao rendimento observa-se um efeito negativo da concentração de enzima, apresentando um declínio de $\cong 200\%$ entre 0,05 e 0,15 g/mL. Esta tendência indica que o aumento da atividade do imobilizado não foi proporcional ao aumento da atividade inicial oferecida, vinculada a massa de enzima empregada nos ensaios.

Este comportamento pode estar relacionado a formação de aglomerados enzimáticos, na qual é favorecida pelo aumento da concentração de enzimas, dificultando o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima, principalmente as que se encontram no interior dos referidos aglomerados, interferindo assim na atividade de esterificação da enzima e, consequentemente, no rendimento de imobilização.

Em relação ao efeito negativo da concentração da enzima, os resultados estão coerentes com alguns estudos reportados na literatura que indicam que quanto mais concentrada a solução de enzima utilizada na imobilização, mais heterogênea apresenta-se a distribuição interna da enzima imobilizada. A enzima tende a se acumular nas camadas mais superficiais da partícula do suporte, o que interfere na quantidade de enzima imobilizada e na medida da atividade enzimática do derivado (RODRIGUES et al., 2008).

Cabe destacar que os valores de rendimento de imobilização obtidos neste estudo ($\cong 300\%$), na sua maior parte, são superiores aos encontrados na literatura para suportes

semelhantes obtidos por meio da técnica sol-gel (BAYRAMOGLU; YILMAZ; ARICA, 2004; SOARES et al., 2006; SOUZA et al., 2014).

O efeito positivo observado para a utilização do aditivo de PEG no processo de imobilização é semelhante ao reportado pela literatura e, foi vinculado a melhor distribuição da enzima sobre a superfície de suporte, e, ao fato do PEG afetar o nível de umidade, proporcionado pela modificação da hidrofobicidade do microambiente, favorecendo o contato da enzima imobilizada com o meio reacional, por conseguinte, as condições de reação (MOHIDEM; MAT, 2012).

Além disso, a utilização do aditivo também pode influenciar a morfologia dos poros do gel, facilitando desse modo, a transferência de massa interna e proporcionando uma maior acessibilidade do substrato (YI; NEUFELD; KERMASHA, 2007). Tal consideração corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

Para confirmar a tendência dos resultados preliminares, um DCCR 2² completo foi realizado visando otimizar o processo de imobilização e obter máxima atividade de esterificação. O DCCR foi realizado para a lipase imobilizada em xerogel e aerogel.

A Tabela 4.2 e 4.3 apresentam a matriz experimental e o resultado obtidos para a AE para as diferentes variáveis e níveis estudados no DCCR.

Tabela 4.2 - Matriz experimental do DCCR para a atividade de esterificação (AE) da lipase imobilizada em xerogel nas diferentes concentrações de enzima e aditivo

Experimentos	Enzima (g/mL)	Aditivo (g/mL)	Massa final xerogel (g)	AE (U/g) $\pm \sigma$	AE _{Predita} (U/g)	DR (%)
1	-1 (0,05)	-1 (0,10)	6,48	463,40 $\pm$ 17,84	411,48	11,20
2	+1 (0,15)	-1 (0,10)	7,00	424,76 $\pm$ 12,14	365,74	13,90
3	-1 (0,05)	+1 (0,30)	7,58	338,05 $\pm$ 13,62	339,99	-0,57
4	+1 (0,15)	+1 (0,30)	7,88	70,09 $\pm$ 11,68	64,93	7,37
5	-1,41 (0,029)	0 (0,20)	7,13	319,58 $\pm$ 7,01	343,25	-7,41
6	+1,41 (0,17)	0 (0,20)	8,16	83,33 $\pm$ 11,90	117,08	-40,50
7	0 (0,10)	-1,41 (0,059)	6,94	428,13 $\pm$ 6,62	495,04	-15,63
8	0 (0,10)	+1,41 (0,341)	8,88	242,06 $\pm$ 18,18	232,58	3,92
9	0 (0,10)	0 (0,20)	7,83	538,52 $\pm$ 18,01	540,07	-0,29
10	0 (0,10)	0 (0,20)	7,90	533,49 $\pm$ 17,84	540,07	-1,23
11	0 (0,10)	0 (0,20)	7,77	548,88 $\pm$ 18,36	540,07	1,61

Tabela 4.3- Matriz experimental do DCCR para a atividade de esterificação (AE) da lipase imobilizada em aerogel nas diferentes concentrações de enzima e aditivo

Experimentos	Enzima (g/mL)	Aditivo (g/mL)	Massa final aerogel (g)	AE (U/g) $\pm \sigma$	AE _{Predita} (U/g)	DR (%)
1	-1 (0,05)	-1 (0,10)	3,60	35,82 $\pm$ 16,97	21,36	40,35
2	+1 (0,15)	-1 (0,10)	4,33	202,96 $\pm$ 5,91	171,24	15,63
3	-1 (0,05)	+1 (0,30)	3,68	89,74 $\pm$ 5,49	93,71	-4,42
4	+1 (0,15)	+1 (0,30)	4,70	161,74 $\pm$ 23,67	148,44	8,22
5	-1,41 (0,029)	0 (0,20)	4,64	63,30 $\pm$ 18,13	65,02	-2,71
6	+1,41 (0,17)	0 (0,20)	4,88	183,07 $\pm$ 15,80	209,27	-14,31
7	0 (0,10)	-1,41 (0,059)	4,02	37,40 $\pm$ 5,79	64,42	-72,24
8	0 (0,10)	+1,41 (0,341)	4,90	98,46 $\pm$ 9,79	99,35	-0,91
9	0 (0,10)	0 (0,20)	3,97	249,27 $\pm$ 33,76	247,40	0,75
10	0 (0,10)	0 (0,20)	4,01	249,76 $\pm$ 6,65	247,40	0,94
11	0 (0,10)	0 (0,20)	4,03	243,51 $\pm$ 24,93	247,40	-1,60

AE: Atividade de Esterificação; AE_{Predita}: Atividade de Esterificação Predita pelo Modelo; DR: Desvio relativo $\frac{AE_{\text{experimental}} - AE_{\text{previsto}}}{AE_{\text{experimental}}} \times 100$

As Tabelas 4.2 e 4.3 mostram que, tanto para o xerogel, quanto para o aerogel, as maiores atividades de esterificação foram obtidas no ponto central, utilizando uma concentração de 0,10 g/mL de enzima e 0,20 g/mL de aditivo, indicando que o sistema se encontra otimizado.

Ao comparar os resultados do ponto central observa-se uma redução de $\cong 50\%$ no valor de AE para o aerogel, com $247,5 \pm 3,5$ U/g, em relação ao xerogel, com $540,3 \pm 7,8$ U/g. Esta tendência foi vinculada a remoção do PEG, juntamente com os solventes, na etapa de secagem em meio pressurizado com CO₂, onde o PEG apresenta uma elevada solubilidade devido as interações específicas entre o CO₂ e os grupos funcionais do polímero, que favorecem a solubilidade (WEIDNER et al., 1997; WEISMET et al., 2000). Além disso, o etanol é um bom solvente de PEG a 40°C (YANG; SONG; HE, 2012), esta melhora na solubilidade do PEG pode auxiliar na lixiviação da enzima, contribuindo assim para a diminuição da atividade. Corroborar com ambas as hipóteses a menor massa de imobilizado apresentada pelos aerogéis em relação aos seus xerogéis correspondentes, como podem ser observados na Tabela 4.2 e 4.3.

O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA) (APÊNDICE C), apresentando um bom desempenho do F-teste, na qual os valores de F_{calculados} 21,93 e 24,25 são

superiores ao F_{tabelado} 5,05, para o xerogel e aerogel respectivamente, tornando válido o modelo com confiabilidade de 95%.

As variáveis foram significativas (APÊNDICE D) com um R^2 de 0,95 e 0,96 para o xerogel e aerogel, respectivamente. Isso sugere uma representação satisfatória do processo de imobilização, sendo possível, desta forma, a construção da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 4.2).

Os resultados das Tabela 4.2 e 4.3 foram analisados estatisticamente, obtendo-se um modelo empírico como uma função da enzima e concentração de aditivo para imobilização da lipase em xerogéis e aerogéis (Eq. 4.1 e 4.2).

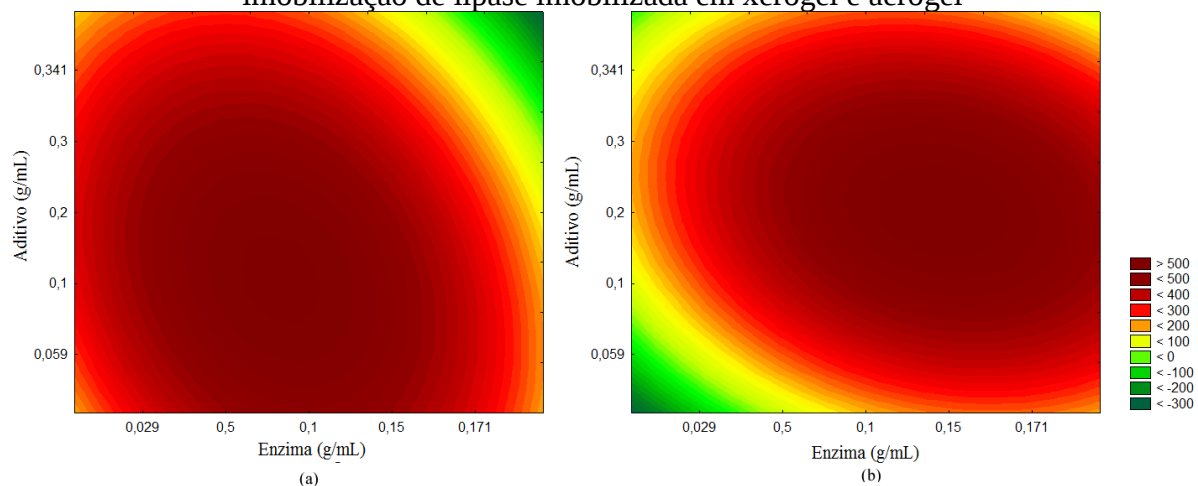
$$AE (U/g)_{xerogel} = 540,07 - 80,20X_1 - 155,88X_1^2 - 93,07X_2 - 88,66X_2^2 - 57,33 X_1X_2 \quad (4.1)$$

$$AE (U/g)_{aerogel} = 247,40 + 51,15X_1 - 55,46X_1^2 + 12,39X_2 - 83,25X_2^2 - 23,79 X_1X_2 \quad (4.2)$$

Onde: $AE_{xerogel}$ e $AE_{aerogel}$ são as atividades de esterificação (U/g) de lipase imobilizada; X_1 : enzima e X_2 : aditivo.

As Equações 4.1 e 4.2 são preditivas da atividade de esterificação (xerogéis e aerogéis, respectivamente) para os fatores estudados. É composto de uma função de segunda ordem da concentração de enzima (X_1) e concentração de aditivo (X_2).

Figura 4.2 - Curvas de contorno da influência da concentração de enzima e aditivo na imobilização de lipase imobilizada em xerogel e aerogel



(a) curva de contorno para a atividade de esterificação em relação à concentração de enzima e aditivo PEG (g/mL) do xerogel; (b) curva de contorno para a atividade de esterificação em relação à concentração de enzima e aditivo PEG (g/mL) do aerogel.

A concentração de enzima e aditivos ótimos foram calculados igualando a primeira derivada da atividade de esterificação em função da enzima e do aditivo igual a zero em ambos os modelos matemáticos.

As atividades máximas de esterificação das lipases imobilizadas em xerogel foram obtidas nos níveis -0,17 e -0,47 para enzima e aditivo, respectivamente, correspondendo a 0,09 g/ml da concentração enzima e 0,15 g/mL da concentração de aditivo.

Para a lipase CALB imobilizadas em aerogel, as atividades máximas de esterificação foram obtidas nos níveis +0,46 e +0,008 para enzima e aditivo, respectivamente, correspondendo a concentração de enzima 0,12 g/mL e aditivo de 0,20 g/mL.

4.3.2 Validação do modelo experimental

As validações foram realizadas em triplicata nas condições ótimas, como descrito pelo modelo estatístico, para confirmar os níveis da concentração de enzima e do aditivo para a obtenção de uma atividade máxima de esterificação.

Pode ser observado na Tabela 4.3 que os valores obtidos no modelo de segunda ordem prevêem o comportamento da atividade de esterificação para a lipase imobilizada em ambos os suportes (xerogel e aerogel).

Tabela 4.4 - Validação das variáveis otimizadas descrito pelo modelo matemático.

Suporte	Enzima (g)	Aditivo (g)	AE (U/g) $\pm \sigma$	AE _{Predito} (U/g)	DR (%)	R (%)
Xerogel	0,09 g	0,15 g	543,65 $\pm$ 18,18	568,78	-4,62	585
Aerogel	0,12 g	0,20g	265,63 $\pm$ 11,72	259,20	2,42	140

AE: Atividade de Esterificação; AEP: Atividade de Esterificação Previsto; DR: Desvio relativo $\frac{AE_{experimental} - AE_{previsto}}{AE_{experimental}} \times 100$; R: Rendimento de imobilização

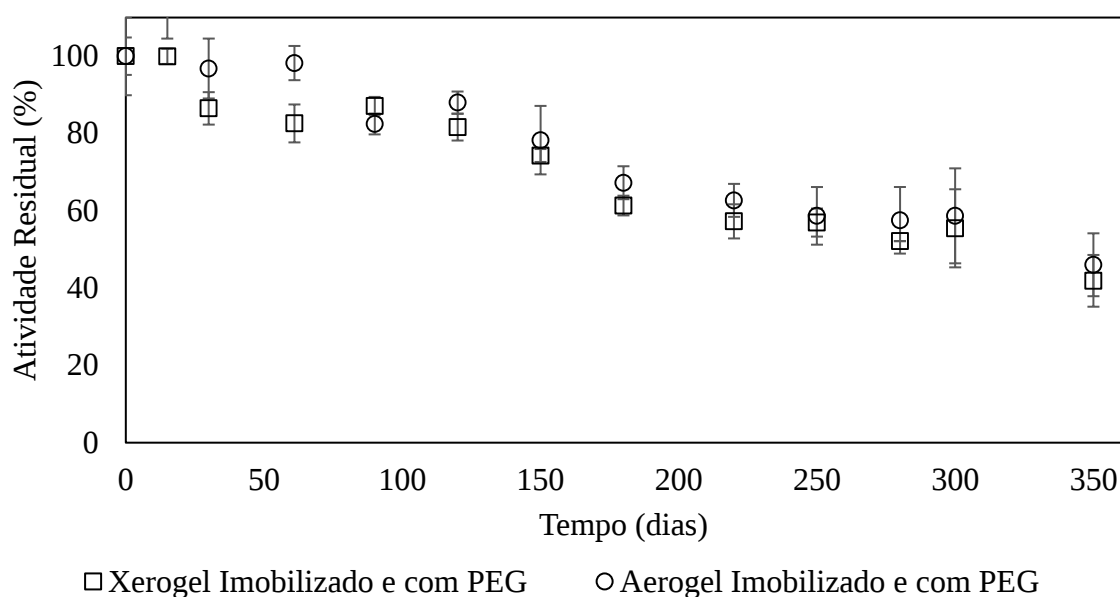
De acordo com a Tabela 4.4, o desvio relativo (DR%) para a imobilização em xerogel foi -4,62% e para o aerogel foi de 2,42%. Além disso, observa-se rendimentos acima de 100%, com o xerogel apresentando maior rendimento de imobilização (585%).

Os resultados demonstram que o modelo obtido é adequado para explicar o processo de imobilização e pode prever os valores de atividade de esterificação, mesmo quando manipulados os dados das variáveis estudadas. Além disso, ambos suportes apresentaram bons rendimentos de imobilização, sendo que o maior rendimento foi obtido para o xerogel.

4.3.3 Estabilidade de estocagem

Conforme os resultados apresentados no capítulo anterior, realizou-se a estabilidade de estocagem somente sob refrigeração. A Figura 4.3 apresenta a atividade residual para os xerogéis e aerogéis armazenados por um período de 300 dias.

Figura 4.3 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em refrigeração (3°C a 5°C) da CALB imobilizada em sílica xerogel e aerogel

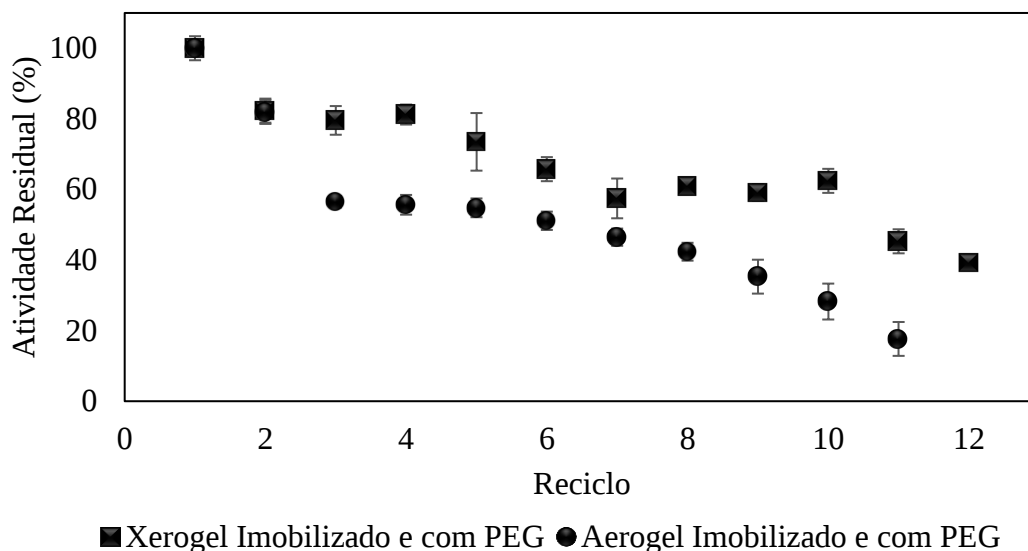


Para a estabilidade de estocagem em refrigeração, os dois suportes, além de apresentarem comportamento semelhante, apresentam maior tempo de estocagem quando comparado com a enzima livre (105 dias). Após 300 dias de estocagem ambos os imobilizados (xerogel e aerogel) sintetizados empregando o PEG como aditivo apresentaram uma AR superior a 50 %.

4.3.4 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional dos xerogéis e aerogéis imobilizado utilizando PEG como aditivo foi verificada em reações de esterificação em regime de bateladas consecutivas com a reutilização do imobilizado. Os resultados obtidos para a estabilidade operacional podem ser visualizados na Figura 4.4.

Figura 4.4 - Estabilidade operacional da CALB imobilizada em sílica xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo



Observa-se uma redução da AR em função do número de reusos para ambos os imobilizados. Ao comparar o xerogel com o aerogel observa-se a possibilidade de utilizar por mais ciclos o xerogel, o qual apresentou no 10º ciclo uma AR de 65%, ou seja, 4 ciclos a mais que o o aerogel, o qual apresentou uma AR de 51% em 6 ciclos. Ao comparar o aerogel com PEG e sem controle (sem o aditivo) (Figura 3.11) observa-se também uma redução de 50% do número de ciclos em relação ao sem aditivo.

Esse comportamento pode estar relacionado a forma de secagem na qual os suportes foram submetidos. No aerogel uma parte do aditivo PEG pode ter sido removido juntamente com os solventes no momento da secagem e isso facilita a lixiviação da enzima do suporte no momento do uso da mesma em processo contínuo como o de reciclo. No caso do xerogel, a maior concentração presente de PEG no imobilizado pode estar dificultando a lixiviação da enzima.

Os resultados obtidos para as estabilidades, tanto para de estocagem quanto para operacional, são semelhantes aos encontrados na literatura para imobilizados em suportes obtidos via sol-gel (YILMAZ; SEZGIN, YILMAZ, 2011; SOUZA et al., 2012; FICANHA et al., 2015).

4.3.4.1 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada por meio do cálculo da constante de desativação térmica (k_d) e do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB imobilizada em aerogel e xerogel com e sem a presença do aditivo PEG (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Constante desativação térmica (K_d), os coeficientes de determinação (R^2) e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB imobilizada em xerogel e aerogel com e sem a presença de aditivo PEG

Aerogel puro				Aerogel imobilizado e com PEG		
Temperatura (°C)	K_d (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)
40	0,12	0,93	6,02	0,07	0,95	9,77
50	0,20	0,93	3,39	0,09	0,92	7,49
60	0,32	0,96	2,17	0,22	0,93	3,19
70	0,57	0,95	1,21	0,46	0,85	1,49
80	1,26	0,88	0,55	1,23	0,97	0,56
Xerogel puro				Xerogel imobilizado e com PEG		
Temperatura (°C)	K_d (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)	K_d (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)
40	0,10	0,96	6,73	0,07	0,90	9,93
50	0,16	0,92	4,37	0,07	0,92	9,78
60	0,22	0,92	3,22	0,09	0,86	7,78
70	0,54	0,98	1,27	0,42	0,92	1,65
80	1,26	0,98	0,55	0,78	0,94	0,89

Com exceção da temperatura de 40°C, todas as demais condições apresentaram para a lipase imobilizada valores de K_d menores e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) maiores aos obtidos para a enzima livre (Tabela 3.5). Os resultados indicam que a estabilidade térmica da enzima imobilizada é maior do que a da enzima livre, sugerindo que o suporte em questão atua protegendo a enzima dos efeitos negativos da temperatura em relação a sua conformação ativa (YANG et al., 2010; ZUBIOLO et al., 2014).

Em relação ao uso do aditivo PEG no processo de imobilização, observa-se, tanto para o xerogel, quanto para aerogel, que sua presença aumenta o tempo de meia vida e reduz o valor da K_d , indicando um efeito positivo do PEG sobre a estabilidade térmica da enzima. O xerogel apresentou o maior aumento do tempo de meia vida de 142% na temperatura de 60°C, e o aerogel teve o maior aumento (120%) na temperatura de 50°C.

Dentre os suportes, o xerogel demonstrou um melhor desempenho na estabilidade térmica em todas as temperaturas. Esses resultados podem estar vinculados a presença de maior quantidade de água na matriz do xerogel do que do aerogel. Os resultados obtidos para esses suportes com a presença do aditivo possibilitam seu emprego em processos que requerem maiores temperaturas.

4.4 Considerações Parciais

No processo de imobilização da lipase CALB em aerogel e xerogel o aditivo PEG mostrou melhor desempenho na AE e estabilidades como aditivo quando utilizado no xerogel, ou seja, quando o processo de obtenção do suporte utiliza a extração do solvente somente por evaporação. Quando utilizado como aditivo no aerogel ocorreu a redução da AE, devido a interação do PEG com o CO₂ no processo de secagem, fazendo com que uma parte do PEG e da enzima fosse eliminado juntamente com os solventes durante a extração.

Em comparação ao controle (sem o aditivo PEG) o aerogel mostrou redução da atividade de esterificação, e da estabilidade operacional, que é uma etapa importante quando estuda a imobilização enzimática. Para a estabilidade de armazenagem e térmica, o aerogel com PEG demonstrou superior ao controle, porém, quando comparado ao xerogel, em todos os testes os xerogéis mostraram melhor desempenho.

Desta forma, o PEG atua como um bom aditivo no processo de imobilização, porém, antes de sua utilização deve ser verificado o processo para obtenção do suporte.

4.5 Referências Bibliográficas

- BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, p. 591-599, 2004.
- BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-Gel Science**, 1st ed., Academic Press, San Diego, p. 108-136, 1990.
- FICANHA, A. M. M. et al. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v. 38, p. 364-369, 2015.
- GUPTA, R.; CHAUDHURY, N. K. Entrapment of biomolecules in solgel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 2387-2399, 2007.
- GUZIK, U.; HUPERT, K. K.; WOJCIESZYŃSKA, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases. **Molecules**, v. 19, p. 8995-9018, 2014.
- HARA, P. et al. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 129-34, 2010.
- HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 107-122, 2011.
- HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185-205, 2013.
- JIN, W.; BRENNAN, J. D. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. **Analytica Chimica Acta**, v. 461, p. 1-36, 2002.
- KHANAHMADI, S. et al. Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 153-61, 2015.
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.
- MOHIDEM, N. A.; MAT, H. B. Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol-gel silica with additives. **Journal Sol-Gel Science Technology**, v. 61, p. 96-103, 2012.
- RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.
- RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.
- SOARES, C. M. F. et al. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 69-76, 2006.

- SOUZA, R. L. et al. Use of polyethylene glycol in the process of sol-gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. **Journal Thermal Analysis Calorimetry**, v. 117, p. 301-306, 2014.
- SOUZA, R. L. et al. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 152-159, 2012.
- STEPANKOVA, V. et al. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, p. 2823-2836, 2013.
- WEIDNER E. et al. Phase equilibrium (solid-liquid-gas) in polyethyleneglycol-carbon dioxide systems. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, p. 139-147, 1997.
- WIESMET, V. et al. Measurement and modelling of high-pressure phase equilibria in the systems polyethyleneglycol (PEG) -propane, PEG-nitrogen and PEG-carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 17, p. 1-12, 2000.
- YANG, Z. Z.; SONG, Q. W.; HE, L. N. **Capture and Utilization of Carbon Dioxide with Polyethylene Glycol**. Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability, Springer, 1st edition, 2012.
- YANG, G. et al. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated aminosilica gel via different methods. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 351-35, 2010.
- YI, Y.; NEUFELD, R., KERMASHA, S. Controlling sol-gel properties enhancing entrapped membrane protein activity through doping additives. **Journal Sol-Gel Science Technology**, v. 43, p. 161-170, 2007.
- YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 35-41, 2011.
- ZUBIOLO, C. et al. Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1781-1788, 2014.

5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CALB EM AEROGEL E XEROGEL UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS COMO ADITIVO

Neste capítulo será apresentada uma breve fundamentação teórica sobre os líquidos iônicos (LIs), suas propriedades e aplicações, dentre elas como aditivo na imobilização enzimática. Serão apresentadas a metodologia e os resultados obtidos para o uso de diferentes LIs como aditivo na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel.

5.1 Fundamentação Teórica

As lipases estão entre as enzimas mais utilizadas para aplicações biotecnológicas, pois desempenham um papel importante nas transformações de vários grupos de lipídios (MESSAOUDI et al., 2011). Melhorar a estabilidade e aumentar a atividade catalítica de uma enzima durante um processo catalítico são os principais objetivos que podem expandir o possível uso de lipases em aplicações industriais práticas (ZDARTA; JESIONOWSKI, 2016).

Entre várias técnicas que melhoram as propriedades das lipases, a imobilização é a que vem apresentando os melhores resultados (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). A imobilização enzimática envolve a incorporação de um biocatalisador a um suporte, produzindo um catalisador em forma heterogênea (ESMAEILNEJAD et al., 2015) que pode ser mais facilmente separado do meio reacional (ZHANG et al., 2012; AN et al., 2014).

Entre as muitas vantagens da imobilização, podem se destacar ainda o aumento da atividade enzimática e a resistência das enzimas com aumento da estabilidade de armazenamento, térmica, química e operacional, (GARCIA-GALAN et al., 2011; ZDARTA; JESIONOWSKI, 2016) visto que, as aplicações de enzimas são frequentemente prejudicadas por uma falta de funcionamento operacional a longo prazo. Além da eficiência, as enzimas imobilizadas para aplicações industriais também devem ser produzidas a custos acessíveis (CANTONE et al., 2013).

As enzimas imobilizadas podem ser obtidas empregando diferentes métodos, tais como adsorção, ligação covalente, aprisionamento ou encapsulamento (SHELDON; VAN PELT, 2013; MIN; YOO, 2014; VAGHARI et al., 2016). Além disso, os métodos de imobilização eficazes são o resultado da combinação de fatores como a escolha da enzima, do processo e do suporte para imobilização (CANTONE et al., 2013).

O uso de suportes pré-existentes para imobilizar enzimas é talvez a estratégia mais difundida de imobilização, em alguns casos usando métodos de adsorção física, em outros casos de ligação covalente (KRAJEWSKA, 2004; WANG; CARUSO, 2005; SHELDON, 2007).

Em relação aos suportes, existem vários tipos que podem ser utilizados no processo de imobilização. Estes são divididos em dois grupos principais: suportes orgânicos e inorgânicos (ZDARTA; JESIONOWSKI, 2016). Dentre os suportes inorgânicos, os óxidos metálicos, sílicas e minerais, são facilmente disponíveis e oferecem alta estabilidade e resistência aos efeitos adversos do meio reacional na qual a enzima imobilizada é empregada (EBADI, et al. 2015; FICANHA et al., 2015).

Entre as estratégias de imobilização, a possibilidade de imobilizar as enzimas *in situ* mediante sua incorporação durante a síntese do suporte, evitando etapas adicionais, está se tornando cada vez mais popular (CAO, 2005; FICANHA et al., 2015).

Os fenômenos físico-químicos que ocorrem no processo de imobilização podem afetar a eficiência da enzima imobilizada em cada sistema de reação ou método específico (CANTONE et al., 2013). As enzimas podem ser desnaturadas e perderem a sua atividade simplesmente quando solubilizadas no meio de imobilização e durante o processo de imobilização. Em muitos casos, a força iônica e o pH podem promover a desnaturação durante a exposição prolongada a tais condições (GARCIA-GALAN et al., 2011). Portanto, soluções devem ser desenvolvidas para cada processo específico, dentre eles o uso de aditivos se destaca.

Dentre os aditivos destaca-se os líquidos iônicos (LIs) pois possuem propriedades e características compatíveis com as da enzima (RÍOS; RANTWIJK; SHELDON, 2012; WEINGARTNER; CABRELE; HERRMANN, 2012) tais como, a baixa pressão de vapor e boa estabilidade dentro de um amplo intervalo de temperatura, além disso são considerados uma boa alternativa como solventes, com potencial de aplicações a nível industrial, dentre elas, as que envolvem a biocatálise (ALVAREZ et al. 2011; ASLANOV, 2011).

Neste sentido, o objetivo desta etapa do trabalho foi imobilizar a lipase CALB em xerogel e aerogel obtidos pela técnica sol-gel utilizando diferentes líquidos iônicos como aditivos.

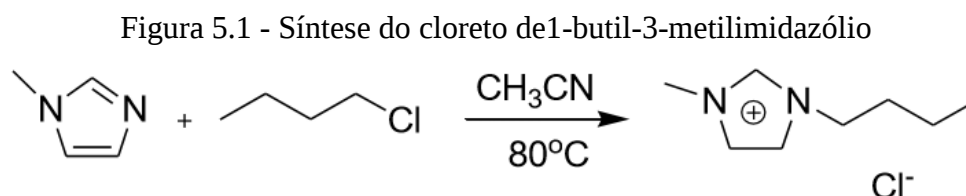
5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Síntese de líquidos iônicos

Os líquidos iônicos que foram empregados como aditivos na imobilização foram sintetizados conforme descritos a seguir. (Mignoni, 2012).

5.2.1.1 Síntese do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (C_4)

O cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, $[C_4MI]Cl$, foi sintetizado utilizando o 1-metilimidazol (135 mL, 139 g, 1,69 mol) e 1-clorobutano (260 mL, 228,8 g, 2,47 mol), como representado na Figura 5.1.



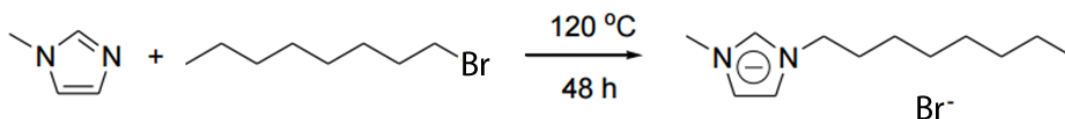
Fonte: Mignoni (2012).

Em uma reação típica os reagentes foram adicionados em um balão de 1 L, dissolvidos em acetonitrila (100 mL), munido de condensador de refluxo. A reação ficou sob aquecimento ($80^\circ C$) e refluxo durante 48 h. Após, foi realizada a etapa de precipitação do líquido iônico adicionando-se 300 mL de acetato de etila sob a solução de $[C_4MI]Cl$, sob agitação magnética. Levou-se o balão para congelador durante 12 horas, posteriormente, o sobrenadante foi retirado. A secagem do sólido foi realizada sob pressão reduzida por 48 horas, para garantir a retirada dos solventes (acetato de etila e acetonitrila).

5.2.1.2 Síntese do brometo de 1-octil-3-metilimidazólio (C_8)

O brometo de 1-octil-3-metilimidazólio, $[C_8MI]Br$, foi sintetizado utilizando 1-metilimidazol (8,5 mL, 8,76 g, 100 mmol) e 1-bromo-octano (16,9 mL, 14,87 g, 100 mmol) como representado na Figura 5.2.

Figura 5.2 - Síntese do brometo de 1-octil-3-metilimidazólio



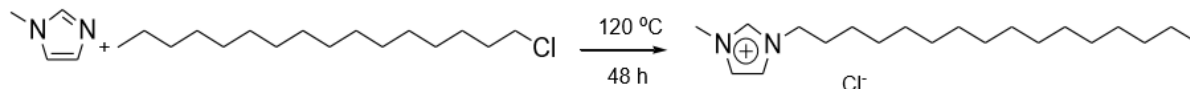
Fonte: Mignoni (2012).

Os reagentes foram adicionados em um balão e dissolvidos em acetonitrila (10 mL). A reação ficou sob agitação magnética e aquecimento de 120 °C durante 48h. Após, a solução foi resfriada até temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Levou-se o balão para congelador durante 12 horas, posteriormente, o sobrenadante foi retirado e o líquido viscoso obtido e seco sob pressão reduzida.

5.2.1.3 Síntese do cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio (C₁₆)

O cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio, [C₁₆MI]Cl, foi sintetizado utilizando o 1-metilimidazol (8,5 mL, 8,76 g, 106 mmol) e o 1-clorohexadecano (32 mL, 27,5 g, 106 mmol) como representado na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Síntese do líquido iônico cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio



Fonte: Mignoni (2012).

Em um balão de 50 mL foram adicionados o 1-metilimidazol e o 1-clorohexadecano. A reação ficou sob agitação magnética e sob aquecimento de 120 °C, durante 48h. Após o término da reação, o balão foi resfriado até a temperatura ambiente, e então foram adicionados 30 mL de acetato de etila sob agitação magnética durante 5 min. Decorrido este tempo o balão foi levado ao congelador para a precipitação do [C₁₆MI]Cl.

5.2.2 Síntese da sílica e imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de diferentes LIs como aditivos

A lipase de *Candida antarctica* (CALB) foi imobilizada em xerogel obtida pela técnica de sol-gel com o uso do tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor da sílica, seguindo metodologia descrita na literatura (FICANHA et al., 2015). Inicialmente, 5 mL de TEOS foram

dissolvidos em 5 mL de etanol absoluto. Após a dissolução, adicionou-se 1,6 mL de água destilada e três gotas do iniciador da reação de polimerização ácido bromídrico (HBr), juntamente com esses reagentes foram adicionados os LIs (quantidades descritas nos testes preliminares e planejamentos). Posteriormente, os sistemas reacionais foram submetidos a uma etapa de agitação, em agitador orbital (shaker) a 40 °C, 180 rpm, por um período de 90 min. Em seguida, fez-se a adição de 1 mL da solução enzimática e 1,75 mL da solução hidrolisante (solução etanólica de hidróxido de amônio 1,0 mol/L). Posteriormente, os sistemas reacionais foram mantidos em condições estáticas, em temperatura entre 20°C e 25 °C, por 24 h para completar a condensação química.

Para obtenção do xerogel, após as 24 h, o suporte foi colocado em dessecador a vácuo (temperatura ambiente) por um novo período de 24 h para completar a secagem por evaporação. Após a secagem em condições brandas de temperatura e pressão obteve-se a lipase imobilizada na sílica, denominada de xerogel imobilizado.

Para o aerogel, após as 24h, o suporte foi seco a 80 bar, 40°C por um tempo de 30 min (condições definidas nos experimentos do capítulo anterior), para completar a secagem pela extração do solvente. Após a secagem em condições supercrítica do CO₂, obteve-se a lipase imobilizada na sílica, denominada de aerogel imobilizado.

5.2.3 Influência da massa de enzima e aditivo (LIs) na imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel

Para avaliar a influência da concentração de enzima e aditivo LIs na atividade de esterificação e do rendimento da lipase CALB imobilizada, testes preliminares foram realizados com diferentes aditivos e concentrações dos mesmos na etapa de imobilização. A concentração de enzima foi fixada em 0,1 g/mL e as concentrações de aditivo testadas na obtenção do xerogel imobilizado (0,5, 1 e 2%) foram baseados em estudo realizado por Souza et al. (2013), na qual demonstraram que a melhor concentração de LIs é 1% em relação a massa de reagentes.

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² completo foi proposto para otimizar as variáveis estudadas e obter máxima atividade de esterificação no xerogel. Os valores das variáveis utilizados no DCCR são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Variáveis reais e codificadas testadas no Delineamento composto Central Rotacional (DCCR) na imobilização da lipase CALB em xerogel

Líquido Iônico	Variáveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
C ₄	X ₁	0,06	0,10	0,20	0,30	0,34
	X ₂	0,30	0,50	1,00	1,50	1,70
C ₈	X ₁	0,06	0,10	0,20	0,30	0,34
	X ₂	0,79	1,00	1,50	2,00	2,20
C ₁₆	X ₁	0,06	0,10	0,20	0,30	0,34
	X ₂	0,79	1,00	1,50	2,00	2,20

X₁: enzima (g/mL); X₂: aditivo LIs (%)

Para a confirmação dos níveis ótimos de enzima e aditivo, experimentos em triplicata foram realizados nas condições ótimas descritas pelo modelo estatístico. Após a confirmação, realizou-se os testes de estabilidade operacional e de armazenagem dos xerogéis e aerogéis otimizados.

5.2.4 Caracterização morfológica da sílica aerogel

Os materiais obtidos foram caracterizados por análise textural de adsorção/dessorção de N₂ e análise termogravimétrica (ATG)

5.2.4.1 Análise textural

As áreas superficiais específicas dos aerogéis sintetizados com e sem enzima foram determinadas com o uso do método BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). O volume e o diâmetro médio dos poros foram calculados pelo método de BJH. Para a análise da área superficial, previamente as amostras foram submetidas a um tratamento térmico a 60 °C com pressão reduzida, por 12 h. A análise foi realizada em temperatura constante de -196 °C (77 K).

5.2.4.2 Análise Termogravimétrica (ATG)

As análises termogravimétricas foram realizadas nas amostras do aerogel com e sem enzima imobilizada. As curvas de ATG foram obtidas pelo equipamento DTG-60H simultâneo com o DTA-TG Shimadzu e analisados no software Thermogravimetric Analyser, tomando por

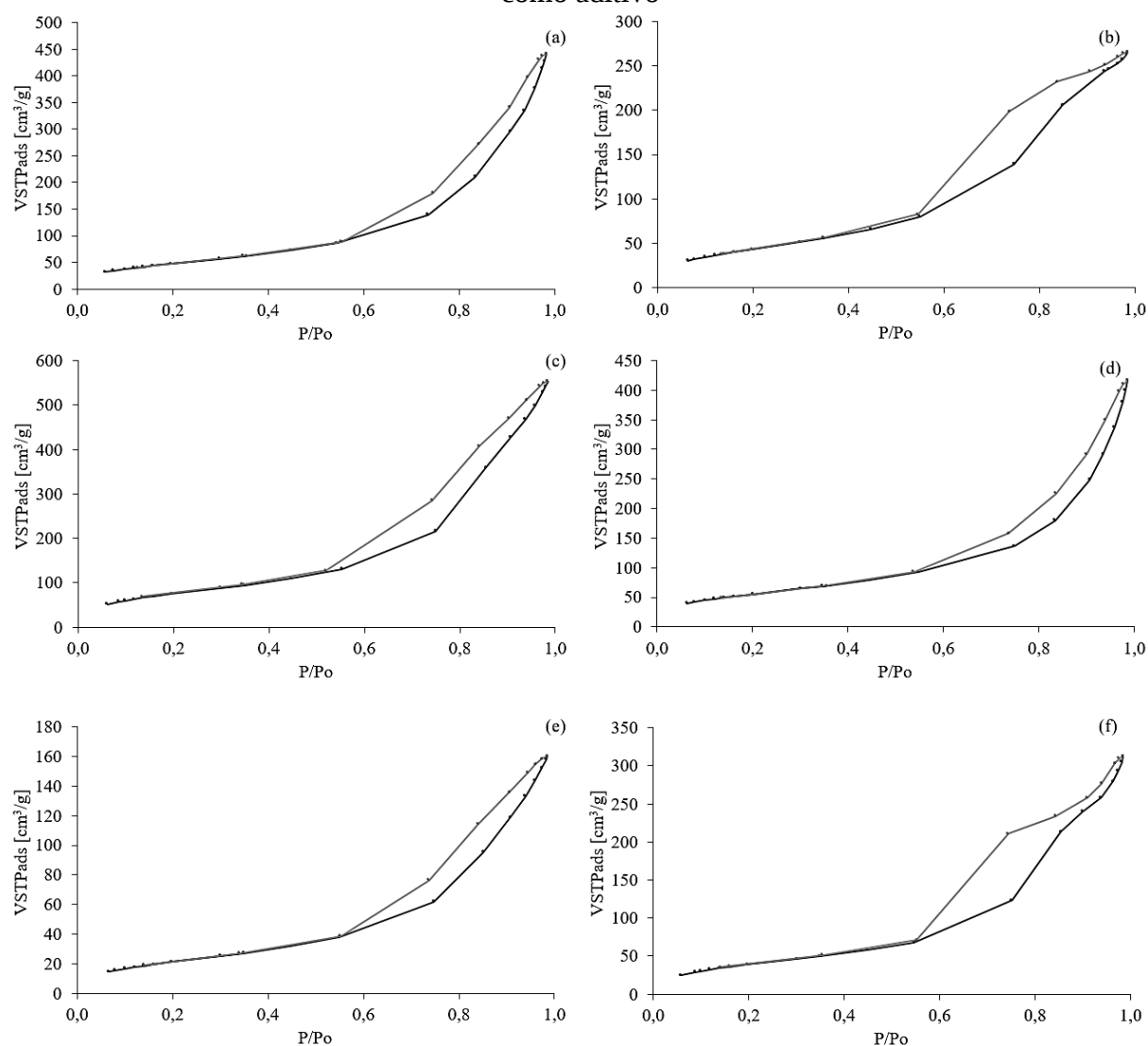
base a perda da massa em função da temperatura. Foram utilizadas como condições operacionais a razão de aquecimento de 20°C/min, na faixa de temperatura ambiente a 600 °C e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Análise textural

Os resultados das análises texturais de adsorção/dessorção de N₂ realizadas nos xerogéis e aerogéis imobilizados na presença de diferentes líquidos iônicos são apresentados na Figura 5.4.

Figura 5.4 - Isoterma de adsorção-dessorção da sílica aerogel e xerogel com enzima e LIs como aditivo



(a) aerogel C₄; (b) xerogel C₄; (c) aerogel C₈; (d) xerogel C₈; (e) aerogel C₁₆; (f) xerogel C₁₆

Os aerogéis, independente da condição de secagem, apresentaram isoterma do tipo IV, que são tipicamente exibidas por materiais mesoporosos (GREGG; SING, 1982; DAS, 2011), como a sílica e com histerese do tipo H2, a qual, de acordo com a classificação IUPAC, corresponde a uma distribuição de tamanhos e formas de poros definida, com poros em forma de “tinteiro”, com gargalo estreito e corpo largo. Resultados semelhantes para esse tipo de material são encontrados na literatura (SOUZA et al., 2012; BARÃO et al., 2014; BARBOSA et al., 2016).

As distribuições de tamanho de poro, área superficial e volume de poros dos xerogéis e aerogéis, determinadas pelo método BJH são apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Características morfológicas dos aerogéis

Amostra	Área superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Tamanho de poro (Å)
Aerogel com enzima sem aditivo (LIs)	297,41	1,01	135,35
Aerogel C ₄	182,92	0,67	161,41
Aerogel C ₈	284,76	0,84	129,55
Aerogel C ₁₆	81,56	0,24	132,69
Xerogel com enzima sem aditivo (LIs)	284,10	1,06	65,20
Xerogel C ₄	164,38	0,41	108,32
Xerogel C ₈	207,25	0,63	130,05
Xerogel C ₁₆	152,24	0,48	140,36

Observa-se para todas as amostras uma redução na área superficial e no volume de poro dos imobilizados gerados com LIs em comparação a amostra imobilizada sem o uso do aditivo líquido iônico. Esta tendência foi vinculada a presença dos LIs, os quais atuam obstruindo os poros do suporte, diminuindo assim a área superficial.

Souza et al. (2012), utilizando líquidos iônicos como aditivos, obtiveram sílicas com área superficial de 278 m²/g. Com o aumento a concentração de aditivo nas amostras imobilizadas ocorreu uma modificação da estrutura porosa e os valores da área específica e volume de poros diminuíram. Esta modificação estrutural causada pela adição de aditivos também foi relatada por Zhou (2005) que a relacionou com a formação de pontes de hidrogênio entre o ânions dos aditivos e os grupos silanol de sílica.

Em relação ao tamanho de poros, observa-se que ocorreu um aumento para todos os xerogéis com o uso de líquidos iônicos e somente no aerogel imobilizado com o LIs C₄. Souza

et al. (2012), relataram que a adição de Aliquat 336 (um sal quaternário) como aditivo durante o processo de imobilização pela técnica de sol-gel da lipase de *Bacillus* sp modificou a estrutura porosa dos derivados imobilizados, proporcionando um aumento do tamanho dos poros. Porém, contrariamente ao obtido no presente trabalho, o estudo apresentou também aumento da área específica e do volume dos poros.

5.3.1.1 Análise Termogravimétrica (ATG)

A perda de massa da lipase CALB livre, dos líquidos iônicos utilizados como aditivos, dos aerogéis e xerogéis com e sem a enzima e com a enzima obtidos na presença dos líquidos iônicos foi determinada por análise termogravimétrica (ATG).

Esta técnica permite a determinação do intervalo de temperatura em que as amostras aquecidas sofrem alteração conformacional, apresentando um perfil de perda de massa.

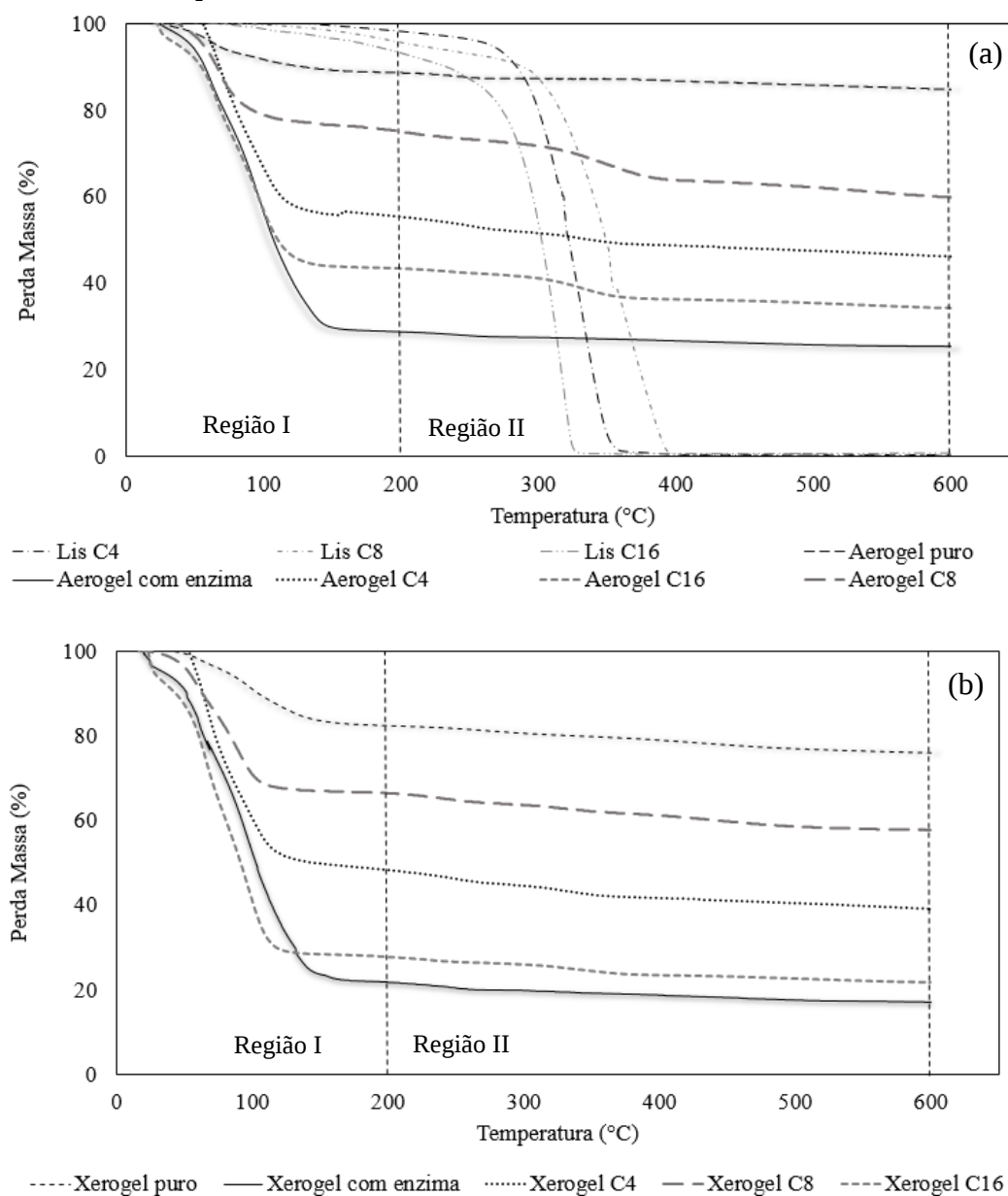
A perda de peso obtida após aquecimento das amostras até 600 °C é apresentada nos termogramas nas Figuras 5.5 e na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Perda de massa do aerogel com e sem enzima imobilizada

Amostra	Perda de Massa (%)		
	Região I	Região II	Total
Aerogel puro	11,25	4,01	15,26
Aerogel com enzima	71,20	3,36	74,56
Aerogel C ₄	44,63	9,22	53,85
Aerogel C ₈	24,99	15,20	40,19
Aerogel C ₁₆	56,56	9,19	65,75
Xerogel puro	17,51	6,37	23,88
Xerogel com enzima	78,10	4,66	82,76
Xerogel C ₄	51,63	9,22	60,85
Xerogel C ₈	33,48	8,63	42,11
Xerogel C ₁₆	72,19	6,07	78,26
Lis C ₄	1,72	97,87	99,59
Lis C ₈	4,30	95,39	99,69
Lis C ₁₆	6,65	92,51	99,16

Os termogramas foram divididos em duas regiões. Na Região I, na qual a temperatura é de aproximadamente 200 °C, ocorre a perda de massa associada, principalmente, com a desidratação, possivelmente de etanol residual da síntese da sílica, decomposição de grupos amino e, geralmente, grupos orgânicos.

Figura 5.5 - Curva termogravimétrica dos diferentes LIs e dos aerogéis (a) e xerogéis (b) com e sem a lipase CALB imobilizada e imobilizada com os diferentes LIs



Na Região II (200 °C a 600 °C), a perda está associada com a condensação de grupos silanol e da perda de alguns componentes orgânicos (C, H, O e N) sob forma de compostos voláteis, incluindo a lipase e a presença de grupos silanois do precursor TEOS que não reagiram, presentes na sílica, devido à incompleta reação sol-gel (MUKHERJEE et al., 2009).

Regiões de temperaturas maiores que 600 °C não é de interesse no estudo de imobilização enzimática. Nessas regiões ocorre a carbonização completa de compostos orgânicos como as enzimas utilizadas no processo de imobilização (BARÃO et al., 2014).

As maiores perdas de massa para as amostras foram observadas na região I, com excessão dos líquidos iônicos puros. Esta perda pode estar relacionada a água presente na superfície dos suportes, bem como nos poros com maior acessibilidade, cuja perda pela evaporação ocorre em temperatura de até 200 °C.

Dentre os suportes utilizados no processo de imobilização os que apresentaram maior perda de massa na região I foram o xerogel e aerogel imobilizado na ausência de líquidos iônicos. O líquido iônico utilizado no processo de imobilização como aditivo contribui para que em temperaturas elevadas não ocorra a evaporação por completo da água que se encontra no interior dos poros.

Nos suportes, as amostras que apresentaram menores perdas foram o aerogel e o xerogel puros. Esta perda de peso na região I pode ser atribuída, uma parte, à presença de grupos silanóis que não reagiram a partir do precursor de sílica utilizado na síntese (TEOS), devido a reações incompletas (MUKHERJEE et al., 2009). Também pode estar contribuindo com a perda de massa nessa região à remoção de moléculas de água ligadas à matriz de sílica (WEI et al., 1999).

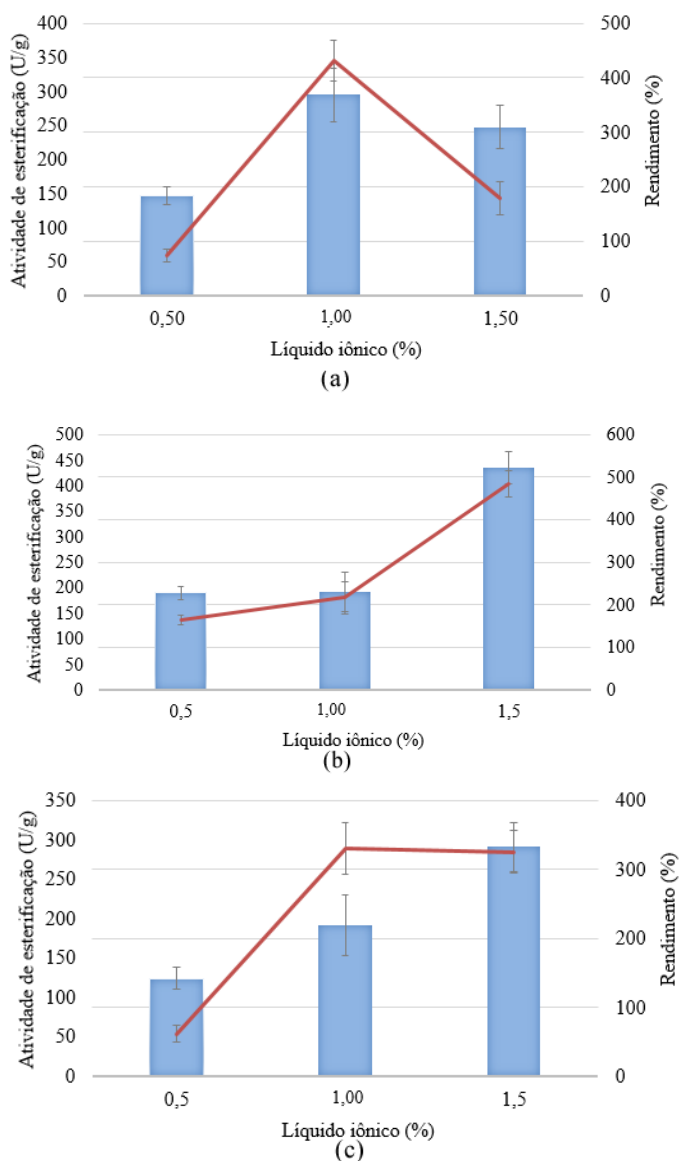
Ao observar os líquidos iônicos estudados no processo de imobilização, o C₈ foi o que apresentou uma menor perda de massa em relação ao mesmo suporte sintetizado sem o uso do aditivo. Tanto para o aerogel como para o xerogel, o uso do LIs C₈ como aditivo proporcionou uma perda de massa aproximadamente 50% inferior aos suportes sinterizados sem seu emprego.

5.3.2 Influência de massas de enzima e aditivo na atividade de esterificação

A Figura 5.6 apresenta a atividade de esterificação e rendimento obtidos nos testes preliminares para as diferentes massas de enzima e aditivo testado na imobilização da lipase CALB em xerogel.

Observam-se comportamentos distintos entre os LIs. Os LIs C₈ e C₁₆ apresentam comportamento similar entre eles, exibindo um aumento contínuo da atividade com a concentração, com as maiores atividades de esterificação ($\cong$ 300 U/g para o C₁₆ e $\cong$ 450 U/g para o C₈) com 1,5%. Para o LI C₄ observa-se um aumento na AE de $\cong$ 150 para $\cong$ 300 U/g quando a concentração do LI aumento de 0,5 para 1,0%. Acima desta concentração a AE tende a diminuir, apresentando para 1,5% uma AE de 250 U/g.

Figura 5.6 - Atividade de esterificação (colunas) e rendimento (linhas) obtidos nos testes preliminares na imobilização da lipase em xerogel com o uso de três diferentes Lis ((a) C₄; (b) C₈ e (c) C₁₆)



Souza et al. (2012) demonstram o efeito positivo do LI na imobilização com um aumento de 35 vezes em comparação com uma amostra de enzima livre. Um efeito positivo da atividade foi observado para todos os Lis até um nível de 1% do teor adicionado em relação aos reagentes utilizados no processo de imobilização.

Considerando somente a maior AE, observa-se uma tendência com a cadeia carbônica do LI, com o C₁₆, com $\cong 450$ U/g, apresentando os maiores valores para a atividade de esterificação. Em relação ao rendimento, como a atividade inicial oferecida foi a mesma em todos os ensaios, esta resposta apresenta a mesma tendência observada para a AE.

A partir destes resultados, elaborou-se a matriz experimental para cada LIs, conforme apresentada na Tabela 5.4

Tabela 5.4 - Matriz experimental do DCCR para a atividade de esterificação (AE) da lipase imobilizada em xerogel nas diferentes concentrações de enzima e aditivo

Experimentos	Enzima (g/mL)	Aditivo (%)	Massa xerogel imobilizado (g)	AE (U/g) $\pm \sigma$	AE _{Predita} (U/g)	DR (%)
C ₄						
1	-1 (0,10)	-1 (0,50)	6,47	97,35 $\pm$ 6,74	98,22	-0,89
2	+1 (0,30)	-1 (0,50)	6,87	175,07 $\pm$ 12,03	182,20	-4,07
3	-1 (0,10)	+1 (1,50)	7,02	231,48 $\pm$ 80,19	201,40	13,00
4	+1 (0,30)	+1 (1,50)	6,50	272,99 $\pm$ 49,77	249,17	8,72
5	-1,41 (0,06)	0 (1,00)	7,20	120,72 $\pm$ 47,21	136,70	-13,24
6	+1,41 (0,34)	0 (1,00)	7,89	222,49 $\pm$ 7,01	229,59	-3,19
7	0 (0,20)	-1,41 (0,30)	5,80	132,28 $\pm$ 11,46	121,87	7,87
8	0 (0,20)	+1,41 (1,70)	6,30	208,33 $\pm$ 50,45	241,83	-16,08
9	0 (0,20)	0 (1,00)	7,10	141,59 $\pm$ 7,01	140,98	0,43
10	0 (0,20)	0 (1,00)	7,50	141,51 $\pm$ 20,43	140,98	0,37
11	0 (0,20)	0 (1,00)	6,89	140,12 $\pm$ 6,65	140,98	-0,61
C ₈						
1	-1 (0,10)	-1 (1,00)	7,21	100,27 $\pm$ 13,89	71,94	28,25
2	+1 (0,30)	-1 (1,00)	7,02	365,03 $\pm$ 6,66	381,78	-4,59
3	-1 (0,10)	+1 (2,00)	5,88	213,79 $\pm$ 11,95	183,30	14,26
4	+1 (0,30)	+1 (2,00)	7,28	378,55 $\pm$ 6,90	393,13	-3,85
5	-1,41 (0,06)	0 (1,50)	7,39	71,55 $\pm$ 7,29	110,43	-54,35
6	+1,41 (0,34)	0 (1,50)	7,26	501,84 $\pm$ 13,79	476,79	4,99
7	0 (0,20)	-1,41 (0,80)	7,20	175,44 $\pm$ 7,07	180,82	-3,07
8	0 (0,20)	+1,41 (2,20)	7,56	258,89 $\pm$ 39,01	267,34	-3,26
9	0 (0,20)	0 (1,50)	7,37	481,08 $\pm$ 7,18	476,59	0,93
10	0 (0,20)	0 (1,50)	7,28	476,50 $\pm$ 14,61	476,59	-0,02
11	0 (0,20)	0 (1,50)	7,15	472,35 $\pm$ 7,11	476,59	-0,90
C ₁₆						
1	-1 (0,10)	-1 (1,00)	6,57	106,13 $\pm$ 42,52	95,38	10,13
2	+1 (0,30)	-1 (1,00)	6,77	204,85 $\pm$ 35,48	180,95	11,67
3	-1 (0,10)	+1 (2,00)	7,12	144,96 $\pm$ 7,17	138,37	4,55
4	+1 (0,30)	+1 (2,00)	6,67	204,79 $\pm$ 29,73	185,04	9,64
5	-1,41 (0,06)	0 (1,50)	7,23	142,09 $\pm$ 26,61	148,10	-4,23
6	+1,41 (0,34)	0 (1,50)	7,88	216,67 $\pm$ 57,74	241,33	-11,38
7	0 (0,20)	-1,41 (0,80)	5,94	72,63 $\pm$ 28,86	90,92	-25,18
8	0 (0,20)	+1,41 (2,20)	6,34	111,72 $\pm$ 21,50	124,11	-11,09
9	0 (0,20)	0 (1,50)	7,47	350,66 $\pm$ 35,73	347,69	0,85
10	0 (0,20)	0 (1,50)	6,38	344,88 $\pm$ 38,67	347,69	-0,81
11	0 (0,20)	0 (1,50)	6,21	347,90 $\pm$ 6,65	347,69	0,06

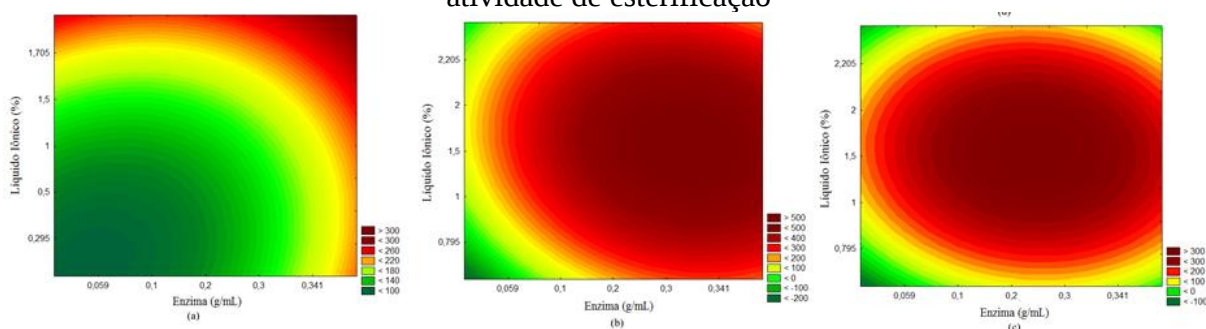
AE: Atividade de Esterificação; AEP: Atividade de Esterificação Previsto; DR: Desvio relativo $\frac{AE_{\text{experimental}} - AE_{\text{previsto}}}{AE_{\text{experimental}}} \times 100$

Os resultados da Tabela 5.4 foram analisados estatisticamente, obtendo-se um modelo empírico como uma função da enzima e concentração de aditivo para imobilização da lipase em xerogéis com o uso de diferentes LI.

Os modelos obtidos foram validados pela análise de variância (ANOVA) (APÊNDICE E), apresentaram um bom desempenho do F-teste, na qual os valores de $F_{\text{calculado}}$ (8,88, 56,30 e 45,23) foram maiores que F_{tabelado} (5,05), respectivamente para os xerogéis imobilizados com LIs C₄, C₈ e C₁₆, tornando válido o modelo com confiabilidade de 95%.

As variáveis foram significativas (APÊNDICE F) e o coeficientes de determinação (R^2) foram de 0,89, 0,98 e 0,97 para xerogéis mobilizados com LIs C₄, C₈ e C₁₆, respectivamente. Desta forma foi possível a apresentação dos modelos matemáticos (Eq 5.1, 5.2 e 5.2) e a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 5.7).

Figura 5.7 - Curvas de contorno da influência da concentração de enzima e aditivo LIs na atividade de esterificação



(a) curva de contorno para a atividade de esterificação em relação à concentração de enzima e líquido iônico C₄ do xerogel; (b) curva de contorno para a atividade de esterificação em relação à concentração de enzima e líquido iônico C₈ do xerogel; (c) curva de contorno para a atividade de esterificação em relação à concentração de enzima e líquido iônico C₁₆ do xerogel

Analisando os resultados, somente os experimentos conduzidos com os LIs C₈ e C₁₆ apresentaram as maiores conversões para o ponto central, sugerindo que ambos os sistemas apresentam uma região de otimização.

Portanto, as Equações 5.1, 5.2 e 5.3 são preditivas da atividade de esterificação (xerogéis imobilizados com os diferentes LIs) para os fatores estudados. É composto de uma função de segunda ordem da concentração de enzima (X_1) e líquido iônico (X_2).

As concentrações de enzima e aditivos ótimos foram calculados a partir dos modelos matemáticos, igualando a primeira derivada da atividade de esterificação em função da enzima e do aditivo igual a zero.

$$AE (U/g)_{C4} = 140,98 + 32,94X_1 + 21,21X_1^2 + 42,54X_2 + 20,56X_2^2 - 9,05 X_1X_2 \quad (5.1)$$

$$AE (U/g)_{C8} = 476,59 + 129,92X_1 - 92,04X_1^2 + 30,68X_2 - 127,01X_2^2 - 25,00 X_1X_2 \quad (5.2)$$

$$AE (U/g)_{C16} = 347,69 + 33,06X_1 - 76,95X_1^2 + 11,77X_2 - 120,81X_2^2 - 9,72 X_1X_2 \quad (5.3)$$

Onde: AEC₄, AEC₈, AEC₁₆ são as atividades de esterificação (U/g) da lipase imobilizada em xerogel com os diferentes LIs; X₁: enzima e X₂: líquido iônico.

A Tabela 5.5 apresenta os níveis codificados obtidos e reais para as atividades máximas de esterificação das lipases imobilizadas em xerogel com os 3 diferentes líquidos iônicos.

Tabela 5.5 - Níveis codificados e reais obtidos pelo modelo matemático dos valores das variáveis ótimas utilizadas na imobilização da CALB em xerogel para obtenção de máxima AE

Xerogel	Nível codificado enzima	Nível codificado aditivo	Valor real enzima (g/mL)	Valor real aditivo (%)
C ₄	+1,04	+1,26	0,30	1,63
C ₈	+0,69	+0,05	0,27	1,52
C ₁₆	+0,212	+0,04	0,22	1,52

Os valores das variáveis reais obtidas para os três suportes demonstraram-se semelhantes, ou seja, mesma tendência para o processo de imobilização. Desta forma, para a obtenção dos aerogéis imobilizados, definiu-se por realizar o processo de imobilização, para os três diferentes líquidos iônicos, considerando os pontos otimizados nos xerogéis.

5.3.3 Validação do modelo experimental

As validações foram realizadas em triplicata nas condições ótimas, como descrito pelo modelo estatístico, para confirmar os níveis da concentração de enzima e do aditivo para a obtenção de uma atividade máxima de esterificação.

Pode ser observado na Tabela 5.6 que os valores obtidos no modelo de segunda ordem preveem o comportamento da atividade de esterificação para a lipase imobilizada em xerogel.

Tabela 5.6 - Validação das variáveis otimizadas descrito pelo modelo matemático para o xerogel imobilizado com diferentes LIs

Xerogel	Enzima (g/mL)	Aditivo (%)	AE (U/g) $\pm \sigma$	AE _{Predito} (U/g)	DR (%)	R (%)
C ₄	0,30 g	1,63 g	243,64 $\pm$ 13,88	273,40	-12,21	860
C ₈	0,27 g	1,52 g	512,58 $\pm$ 18,79	522,77	-1,99	1301
C ₁₆	0,22 g	1,52 g	337,39 $\pm$ 34,37	351,44	-4,16	1067

AE: Atividade de Esterificação; AEPz: Atividade de Esterificação Previsto; DR: Desvio relativo $\frac{AE_{experimental} - AE_{previsto}}{AE_{experimental}} \times 100$; R: Rendimento de imobilização

Os resultados indicam que o modelo obtido é adequado para explicar o processo e pode prever os valores de atividade de esterificação, quando manipulado os dados das variáveis estudadas. Observa-se desvio relativos baixos para os três imobilizados, o que demonstra que o modelo representa de forma correta o processo de imobilização para os diferentes líquidos iônicos estudados.

A AE foi maior para o xerogel imobilizado utilizando como aditivo o LIs C₈. Esta diferença pode estar relacionada ao estado físico dos LIs. Na temperatura utilizada para a imobilização, o C₈ encontra-se no estado líquido. Por outro lado, o C₄ e C₁₆, nestas mesmas condições, encontram-se no estado sólido. Desta forma, o C₈ possivelmente proporcione uma melhor proteção da enzima contra a contração do gel na etapa de policondensação.

Quando os LIs se encontram no mesmo estado físico, observa-se um aumento da AE e rendimento do C₄ para o C₁₆. Este comportamento pode ser atribuído ao tamanho da cadeia dos LIs utilizado na imobilização. Souza et al. (2013) mostraram em seus estudos que quanto maior a cadeia do líquido iônico, maior seu caráter hidrofóbico e melhor eficiência na atividade enzimática. Isso deve-se a possibilidade da formação de uma camada de hidratação ao redor da enzima favorecendo a atividade enzimática e induzindo a água para mais próximo da enzima. Além disso, os três imobilizados apresentaram altos rendimentos de imobilização. Resultados semelhantes, demonstrando a eficiência do uso de LIs no processo de imobilização para xerogel com elevados rendimentos de imobilização e AE são reportados na literatura (ZARCULA et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

Considerando que os valores das variáveis reais obtidas para os três suportes demonstraram-se semelhantes, ou seja, mesma tendência para o processo de imobilização, para a obtenção dos aerogéis imobilizados, definiu-se por realizar o processo de imobilização, para os três diferentes líquidos iônicos, considerando os pontos otimizados nos xerogéis.

A Tabela 5.7 apresenta os valores para AE e rendimento dos aerogéis imobilizados com os diferentes LIs.

Tabela 5.7 - AE dos aerogéis imobilizado com diferentes LIs

Aerogel	Massa aerogel imobilizado (g)	AE (U/g) $\pm \sigma$	R (%)
C ₄	3,20	316,32 $\pm$ 13,88	328,66
C ₈	3,26	296,98 $\pm$ 18,79	314,55
C ₁₆	3,33	282,24 $\pm$ 34,37	305,17

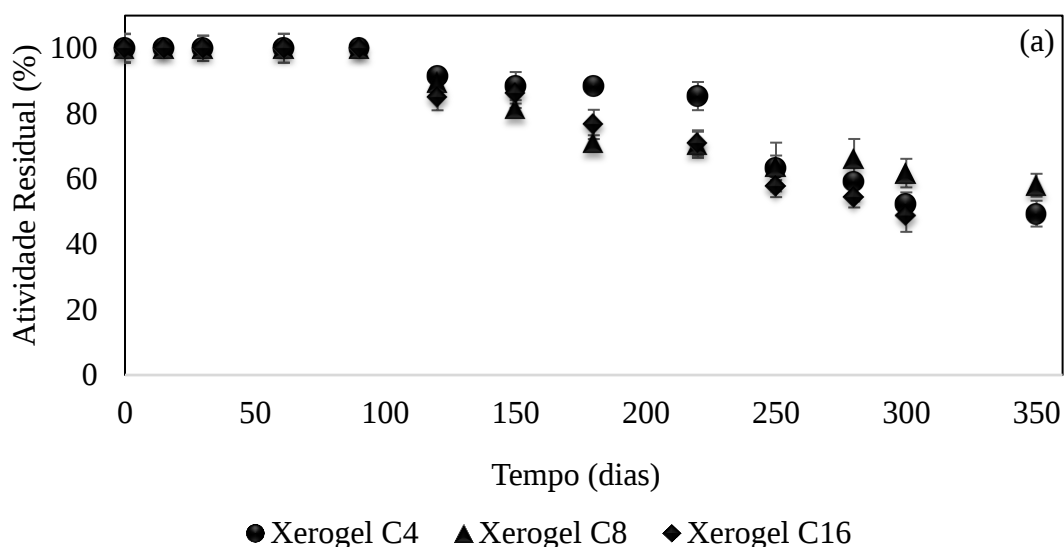
Os aerogéis imobilizados apresentaram para os diferentes LIs rendimento de imobilização superiores a 300%. Ao comparar os valores de rendimento dos xerogéis (Tabela 5.4), observa-se uma redução nos aerogéis. Esta tendência foi vinculada ao processo de secagem, o qual é conduzido empregando alta pressão, condição esta que pode contribuir para a lixiviação da enzima do suporte, interferindo assim nos valores de AE, e consequentemente no rendimento de imobilização.

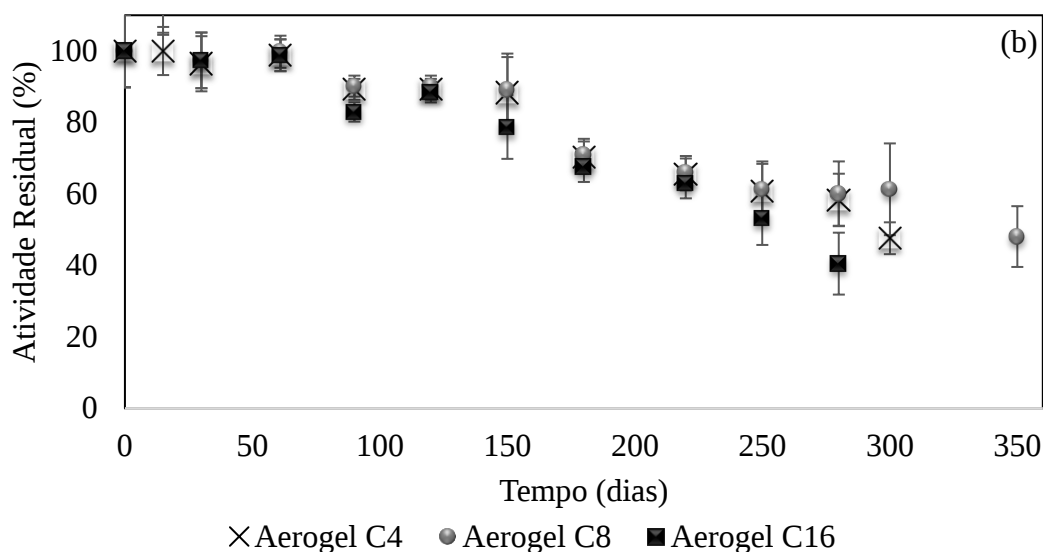
5.3.4 Estabilidades estocagem, operacional e térmica

5.3.4.1 Estabilidade de estocagem

Conforme os resultados apresentados no capítulo anterior, realizou-se a estabilidade de estocagem somente sob refrigeração. A Figura 5.8 apresenta a atividade residual para os xerogéis e aerogéis armazenados por um período de 350 dias.

Figura 5.8 - Atividade residual na estabilidade de estocagem em refrigeração da CALB imobilizada em sílica xerogel e aerogel na presença de diferentes LIs





Para a estabilidade de estocagem em refrigeração, os dois suportes apresentam maior tempo de estocagem quando comparado com a solução de enzima livre (105 dias). Após 350 dias de estocagem o xerogel apresentou maior atividade residual independente do LIs utilizado como aditivo em comparação aos aerogéis. O maior tempo de armazenamento foi de 350 dias para o xerogel C₈ com uma AR de 58% e para o aerogel aproximadamente 300 dias com uma AR de 61%.

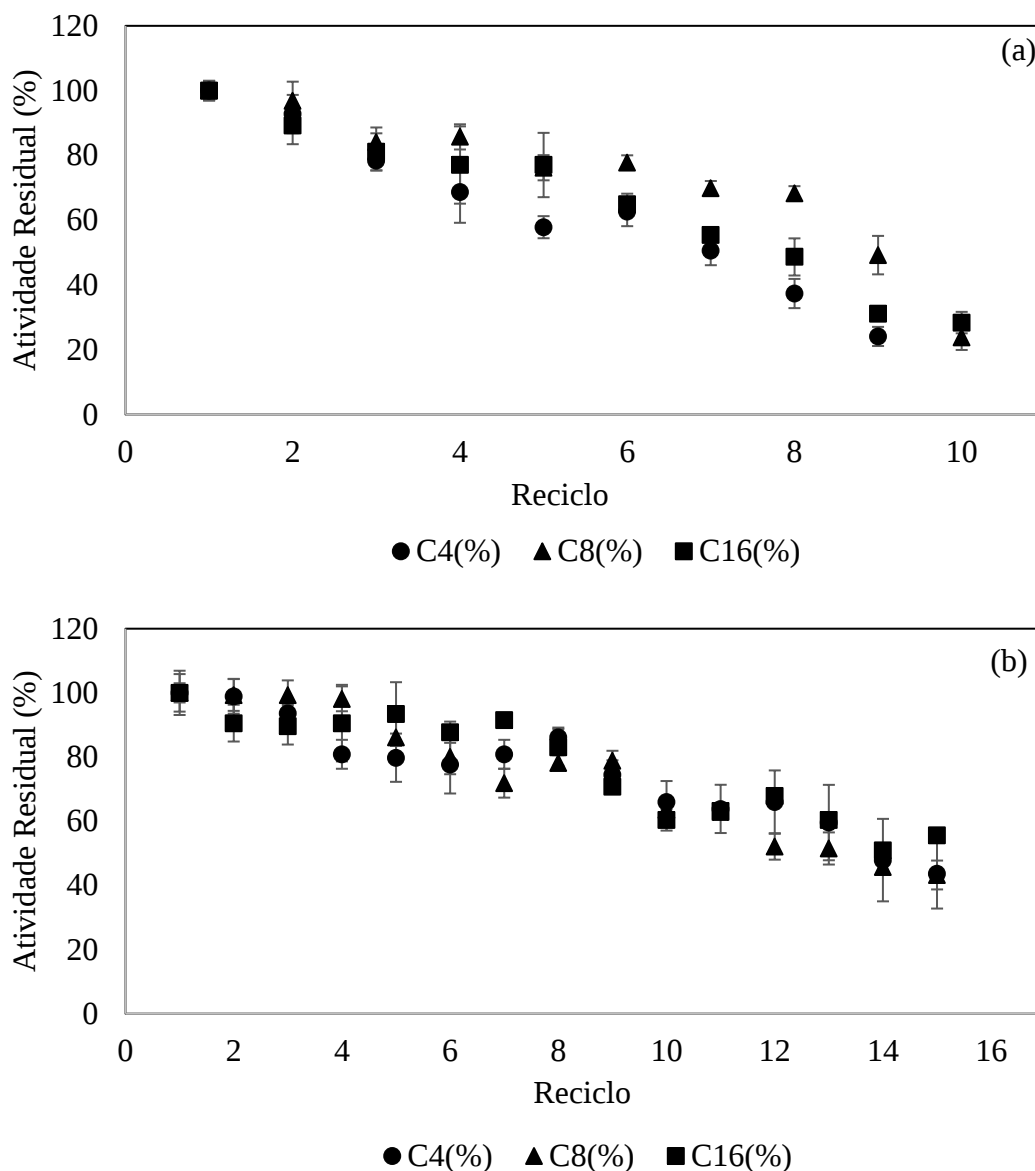
Por outro lado, o aerogel com o uso do LIs C₁₆ apresentou tempo de estocagem similar ao seu controle (aerogel sem LIs) (Figura 3.10), demonstrando desta forma que para a estabilidade de estocagem, o uso do aditivo não foi eficiente.

5.3.4.2 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional verificada por meio da reutilização da lipase imobilizada é um fator importante para possíveis aplicações industriais, bem como para determinar a eficiência do processo de imobilização (CATONE et al., 2013).

A estabilidade operacional dos xerogéis e aerogéis imobilizados utilizando diferentes LIs como aditivo foi verificado em regime de bateladas consecutivas com a reutilização do imobilizado, empregando como reação modelo a síntese do oleato de etila. Os resultados obtidos para a estabilidade operacional podem ser visualizados na Figura 5.9.

Figura 5.9 - Estabilidade operacional da CALB imobilizada em sílica aerogel (a) e xerogel (b) com o uso de diferentes líquidos iônicos como aditivo



Verifica-se que a atividade da lipase imobilizada, independente do suporte e do líquido iônico utilizado diminui à medida que aumenta o número de ciclos biocatalíticos. Ao comparar os aerogéis (a) aos xerogéis (b) observa-se a possibilidade de utilizar por mais ciclos o xerogel, independente do líquido iônico utilizado. Os xerogéis apresentaram a possibilidade de reutilização, em média, por 13 vezes com AR superior a 50%. Em contrapartida, os aerogéis mostraram a capacidade de reutilização em média, por 8 vezes com AR superior a 50%.

Além disso ao comparar ao controle (aerogel sem LIs) (Figura 3.11) observa-se a redução da estabilidade operacional dos aerogéis, independente do tipo de LIs utilizado.

A perda de atividade residual entre os ciclos normalmente esta vinculada a desativação enzimática ou perda de enzima da estrutura do suporte por lixiviação. Neste contexto, as diferenças observadas para os resultados de estabilidade operacional entre os diferentes suportes (aerogéis e xerogéis) e ao controle foram relacionadas a forma como os imobilizados foram secos. Enquanto os xerogéis foram secos em temperatura e pressão ambiente, os aerogéis foram secos em meio pressurizado de CO₂.

O emprego de altas pressões para a obtenção dos aerogéis proporciona uma perda de massa maior que a observada nos xerogéis (Tabelas 5.4 e 5.7), provavelmente vinculadas aos LIs utilizados. A remoção do LI do interior dos poros dos imobilizados, onde o mesmo atua também como uma barreira física, contribui para a lixiviação da enzima da estrutura do imobilizado, contribuindo assim para a perda de atividade residual entre os ciclos.

Comparativamente com os seus pares sintetizados sem LIs, empregando PEG como aditivo (Figura 4.4), apresentaram um aumento de aproximadamente 30% nos ciclos considerando como referencia a atividade residual superior a 50%, indicando que os LIs como aditivos são mais eficientes que o PEG para os xerogéis.

5.3.4.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada por meio do cálculo da constante de desativação térmica (k_d) e do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB imobilizada em aerogel e xerogel com e sem a presença dos diferentes LIs utilizados como aditivo (Tabela 5.8).

Todas as condições de imobilização da lipase em aerogel e xerogel sem e com a presença de diferentes LIs como aditivo apresentaram valores de K_d menores e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) maiores aos obtidos para a enzima livre (Tabela 3.5). Esse comportamento indica que a estabilidade térmica da enzima imobilizada (independente do tipo de suporte e aditivo utilizado) é maior do que a da enzima livre, sugerindo que os suportes em estudo atuam protegendo a enzima dos efeitos negativos da temperatura em relação a sua conformação ativa (ZIBIOLLO et al., 2014; YANG et al., 2010).

Em relação ao tipo de suporte, os xerogéis (independente do uso de aditivos) apresentam uma maior estabilidade térmica em comparação ao aerogel em todas temperaturas estudadas. O uso dos LIs como aditivos quando comparado aos suportes puros, apresentam aumento do tempo de meia vida e redução do valor da K_d .

Tabela 5.8 - Constante desativação térmica (K_d), os coeficientes de determinação (R^2) e tempos de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase CALB imobilizada em xerogel e aerogel com e sem a presença de aditivo LIs

Aerogel puro				Aerogel C ₄			Aerogel C ₈			Aerogel C ₁₆		
Temperatura	K_d	R^2	$t_{1/2}$	K_d	R^2	$t_{1/2}$	K_d	R^2	$t_{1/2}$	K_d	R^2	$t_{1/2}$
(°C)	(h ⁻¹)		(h)	(h ⁻¹)		(h)	(h ⁻¹)		(h)	(h ⁻¹)		(h)
40	0,12	0,93	6,02	0,09	0,93	7,60	0,07	0,91	10,11	0,11	0,91	6,14
50	0,20	0,93	3,39	0,09	0,93	7,49	0,07	0,90	9,93	0,18	0,96	3,84
60	0,32	0,96	2,17	0,30	0,91	2,30	0,09	0,86	7,78	0,31	0,91	2,25
70	0,57	0,95	1,21	0,52	0,90	1,33	0,42	0,92	1,65	0,54	0,94	1,29
80	1,26	0,88	0,55	1,21	0,93	0,57	0,78	0,94	0,89	1,21	0,93	0,57
Xerogel puro				Xerogel C ₄			Xerogel C ₈			Xerogel C ₁₆		
Temperatura	K_d	R^2	$t_{1/2}$	K_d	R^2	K_d	K_d	R^2	$t_{1/2}$	K_d	R^2	$t_{1/2}$
(°C)	(h ⁻¹)		(h)	(h ⁻¹)		(h ⁻¹)	(h ⁻¹)		(h)	(h ⁻¹)		(h)
40	0,10	0,96	6,73	0,08	0,91	8,77	0,06	0,91	12,26	0,09	0,97	7,70
50	0,16	0,92	4,37	0,09	0,91	7,77	0,07	0,96	10,21	0,15	0,96	4,48
60	0,22	0,92	3,22	0,21	0,86	3,34	0,08	0,91	8,54	0,21	0,95	3,29
70	0,54	0,98	1,27	0,50	0,92	1,38	0,38	0,94	1,80	0,50	0,95	1,38
80	1,26	0,98	0,55	1,13	0,94	0,61	0,73	0,93	0,95	1,21	0,93	0,57

Em relação aos LIs, o C₁₆ apresentou valores semelhantes nos dois tipos de suportes quando comparado a suas matrizes puras. O LIs C₈ apresentou maior estabilidade para os dois suportes em comparação aos outros LIs utilizados, com o xerogel apresentando, em comparação a todos os outros suportes testados, melhor desempenho na estabilidade térmica em todas as temperaturas. O maior aumento do tempo de meia vida foi de 165% (em comparação ao xerogel puro) na temperatura de 60°C.

Esses resultados podem estar vinculados a presença de maior quantidade de água na matriz do xerogel, consequência do processo empregado na secagem do imobilizado o qual é conduzido a temperatura ambiente, proporcionando que todo o aditivo utilizado permanece no suporte.

Por outro lado, em comparação ao uso de aditivo, somente o LIs C₈ apresentou maior estabilidade térmica em todas as temperaturas testadas para os dois suportes, quando comparados ao xerogel e aerogel sintetizado com PEG.

Estas observações sugerem que o processo de imobilização pode proteger as moléculas enzimáticas contra alterações conformacionais causadas pelas altas temperaturas, resultando em uma melhoria na estabilidade térmica da lipase (JIA et al., 2013), permitindo assim que estes imobilizados sejam empregados em sistemas reacionais que requerem maiores temperaturas.

5.4 Considerações Parciais

Os LIs testados como aditivos no processo de imobilização demonstraram melhores resultados para os xerogéis em comparação aos aerogéis imobilizados. Esta melhora pode ser observada nas estabilidades de estocagem, operacional e térmica. Desta forma, o processo de secagem para obtenção do suporte imobilizado influenciou nos resultados obtidos. Ao realizar a secagem do aerogel, os LIs podem interagir com o CO₂ e uma parte ser retirada juntamente com a enzima no momento de extração do solvente, e como consequência reduzindo a AE e os resultados de sua aplicação.

Apesar das diferenças obtidas para as formas de secagem, de uma maneira geral, os LIs a base de cátion aprótico (imidazólio) demonstraram ser bons aditivos utilizados no processo de imobilização da lipase CALB pela técnica sol-gel principalmente no que se refere a estabilidade térmica. No qual o LIs C₈ apresentou maiores tempos em todas temperaturas testadas tanto para o xerogel quanto para o aerogel.

5.5 Referências Bibliográficas

- ALVAREZ, V. H. et al. Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxy ethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}. **Journal Chemistry Thermodynamics**, v. 43, p. 997-1010, 2011.
- AN, J. D. et al. Immobilization of lipase on woolen fabrics: enhanced effectiveness in stain removal. **Biotechnol Progress**, v. 30, p. 806-817, 2014.
- ASLANOV, L. A. Ionic liquids: Liquid structure. **Journal of Molecular Liquids**, v. 162, p. 101-104, 2011.
- BARÃO, C. E. et al. Characterization of biocatalysts prepared with thermomyces lanuginosus lipase and different silica precursors, dried using aerogel and xerogel techniques. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 263-274, 2014.
- BARBOSA, A. S. et al. The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. **Química Nova**, v. 39, p. 415-422, 2016.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.
- CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6262-6276, 2013.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 217-226, 2005.
- DAS, S. **Immobilization of Enzymes in Sol-Gel Mesoporous Silica, Enzymatic Digestion of Biomass, and Silica-Curcumin Hybrid Materials**. Thesis the Faculty of Drexel University, March 2011.
- EBADI, S. V. et al. Immobilization of acetylcholinesterase on electrospun poly (acrylic acid)/multi-walled carbon nanotube nanofibrous membranes. **RSC Advanced**, v. 5, p. 42572-42579, 2015.
- ESMAEILNEJAD, A. P. et al. Amine-functionalized magnetic nanocomposite particles for efficient immobilization of lipase: Effects of functional molecule size on properties of the immobilized lipase. **RSC Advanced**, v. 5, p. 33313-33327, 2015.
- FICANHA, A. M. M. et al. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v. 38, p. 364-369, 2015.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2885-2904, 2011.
- GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface area and Porosity**. Academic Press: London, 1982.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzymes immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p. 801-821, 2014.

- JIA, J. et al. Enhancing catalytic performance of porcine pancreatic lipase by covalent modification using functional ionic liquids. **ACS Catalysis**, v. 3, p. 1976-1983, 2013.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.
- MESSAOUDI, A. et al. Lipabase: a database for 'true' lipase family enzymes. **International Journal of Bioinformatics Research and Application**, v. 7, p. 390-401, 2011.
- MIGNONI, M. L. **Zeólitas obtidas com líquidos iônicos como direcionadores de estrutura: síntese e reatividade**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- MIN, K.; YOO, Y. J. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 553-567, 2014.
- MUKHERJEE, I. et al. Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous silica nanospheres. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 122, p. 168-174, 2009.
- RÍOS, A. P.; RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A.; Effective resolution of 1-phenyl ethanol by *Candida antarctica* lipase B catalysed acylation with vinyl acetate in protic ionic liquid (PILs). **Green Chemistry**, v. 14, p. 1584-1588, 2012.
- SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v 349, p. 1289-1307, 2007.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how? **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.
- SOUZA, R. L. et al. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 141-150, 2013.
- SOUZA, R. L. et al. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 152-159, 2012.
- VAGHARI, H. et al. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 223-233, 2016.
- WANG, Y.; CARUSO, F. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 953-961, 2005.
- WEI, Y. et al. Preparation and Physisorption Characterization of d-Glucose-Templated Mesoporous Silica Sol-Gel Materials. **Chemistry of Materials**, v. 11, p. 2023-2029, 1999.
- WEINGARTNER, H.; CABRELE, C.; HERRMANN, C. How ionic liquids can help to stabilize native proteins. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, p. 415-426, 2012.
- YANG, G. et al. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated aminosilica gel via different methods. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 351-35, 2010.

- ZARCULA, C. et al. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 79-86, 2010.
- ZDARTA, J.; JESIONOWSKI, T. Luffa cylindrica sponges as a thermally and chemically stable support for *Aspergillus niger* lipase. **Biotechnology Progress**, v. 32, p. 657-665, 2016.
- ZHANG, B. et al. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 61-70, 2012.
- ZHOU, Y. Recent advances in ionic liquids for synthesis of inorganic nanomaterials. **Current Nanoscience**, v. 1, p. 35-42, 2005.
- ZUBIOLO, C. et al. Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1781-1788, 2014.

6 CONCLUSÃO

Um dos desafios na área de imobilização enzimática é obter um suporte com enzima imobilizada que mantenha sua atividade e demonstre estabilidade de armazenagem, térmica e operacional.

Desta forma, os resultados obtidos demonstram a importância do estudo dos diferentes aditivos e métodos de secagem para imobilização da lipase CALB na imobilização enzimática pela técnica sol-gel. A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, pode-se completar que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados, ou seja, a imobilização da enzima lipase com o uso de diferentes aditivos e métodos de secagem.

No que diz respeito a obtenção dos aerogéis imobilizados, observou-se a importância do estudo do tempo e das condições de pressão e temperatura para a obtenção de aerogéis. O estudo dessas condições demonstrou o efeito da densidade do CO₂, na qual, as AE foram maiores nas menores densidade do gás com um tempo de 30 minutos, diferente dos maiores tempos de extração descritos na literatura.

Para os aerogéis o uso de aditivos não apresentou resultados satisfatórios na maioria dos testes realizados. Estes resultados demonstram a interação dos aditivos utilizados (PEG e LIs) com o CO₂ no processo de secagem, no momento da extração dos solventes, que pode estar relacionado a lixiviação de uma parte dos aditivos e também da enzima.

Desta forma, reduzem a AE dos suportes imobilizados obtidos e diminuem principalmente a estabilidade operacional. Por outro lado, o uso de aditivos auxilia no aumento da estabilidade térmica. Quando comparado os resultados do uso, tanto do PEG quanto do LIs, estes foram maiores ao comparar ao aerogel puro. Assim, o uso de aditivos para aerogel é melhor quando deseja-se utilizar em processos em que a enzima imobilizada será adicionada a altas temperaturas.

Os aditivos demonstraram melhores resultados (rendimentos, AE e maiores estabilidades) quando aplicados na síntese do suporte xerogel imobilizado. Quando feita a comparação entre os LIs, o C₈ apresentou melhores resultados em todos os testes resultados. Dentre os aditivos utilizados o uso do PEG apresentou maior AE em comparação ao uso dos LIs. Para o xerogel o PEG e o LIs C₈ demonstraram serem bons aditivos no processo de imobilização. Porém, o LIs C₈ apresentou melhores resultados das estabilidades estudadas quando comparado ao PEG.

Com base no exposto, a área de imobilização enzimática busca estratégias mais eficientes, que utilizem um número reduzido de etapas, e, além disso, aumente a estabilidade

(estocagem, térmica e operacional) da enzima imobilizada. Assim, este trabalho visou contribuir para a área de imobilização enzimática pela técnica sol-gel, propondo-se mediante a utilização de diferentes aditivos e formas de secagem. Os resultados obtidos demonstram a possível utilização nos processos químicos convencionais.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Devido os resultados favoráveis encontrados neste trabalho, sugere-se:

- A imobilização de outras lipases bem como de outras classes de enzimas;
- O estudo do uso de outros LIs no processo de imobilização com diferentes cadeias carbônicas e ânions;
- Utilizar outros precursores de sílica para obtenção de novos suportes (aerogel e xerogel) utilizando PEG e LIs como aditivos na imobilização de lipase ou outras enzimas;
- Testar o uso desses suportes imobilizados na síntese de outros ésteres.

8 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Neste tópico estão apresentadas as publicações científicas provenientes da realização deste trabalho. Alguns trabalhos citados aqui não fazem parte do corpo do documento de tese, mas foram realizados em paralelo e têm fundamental importância no desenvolvimento do trabalho.

8.1 Congressos

FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; BATTISTON, C. S. Z.; BOPSIN, M.; ALVES, G.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. M. Estudo preliminar do uso de LIS como aditivo na imobilização de lipase CALB em xerogel. In: II Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação da URI Erechim e III Congresso Sul-Brasileiro de Engenharia de Alimentos, Erechim, 2016.

LEVANDOSKI, K.; FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; FINGER, P. H.; BOPSIN, M.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. M. Estudo da estabilidade térmica da lipase CALB imobilizada em xerogel pela técnica sol-gel utilizando LIS como aditivo. In: II Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação da URI Erechim e III Congresso Sul-Brasileiro de Engenharia de Alimentos, Erechim, 2016.

FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; BOPSIN, M.; ZENI, J.; MALVESSI, E.; SOUZA, R. ; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. L. Estudo da otimização da imobilização e da estabilidade operacional (reciclo) da lipase CALB imobilizada em xerogel obtidos pela técnica sol-gel. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC, Caxias do Sul, 2016.

FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; LEVANDOSKI, K. L.; BOPSIN, M. ; ZAMADEI, R. ; MIGNONI, M.; DALLAGO, R. M. Imobilização de lipase comercial em xerogel obtido pela técnica sol-gel com três diferentes iniciadores da reação de polimerização. In: XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Cobeq IC, Campinas, São Paulo, 2015. p. 1285.

LEVANDOSKI, K.; FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; BOPSIN, M.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. L. Avaliação da estabilidade térmica e operacional após a imobilização da lipase CALB em xerogel obtida pela técnica de sol-gel. In: IX Simpósio de Alimentos, Passo Fundo, 2015.

LEVANDOSKI, K. L.; FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; BOPSIN, M.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI, M. L. Estudo da imobilização de lipase pela técnica sol-gel utilizando diferentes concentrações de líquido iônico como aditivo. In: IX Simpósio de Alimentos, Passo Fundo, 2015.

ANTUNES, A.; FICANHA, A. M. M.; LEVANDOSKI, K.; BOPSIN, M.; ZENI, J.; DALLAGO, R. M. Estudo comparativo da atividade operacional (reciclos) da lipase Candida antarctica imobilizada in situ em xerogel produzido pelo método sol-gel com e sem a utilização do aditivo PEG. In: I Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e

Inovação da URI Erechim e I Congresso Sul-Brasileiro de Engenharia de Alimentos, Erechim, 2015.

8.2 Periódicos

LEVANDOSKI, K.; FICANHA, A. M. M.; ANTUNES, A.; DALLAGO, M. R.; MIGNONI, M. Imobilização da lipase CAL B em xerogel obtido pela técnica sol-gel utilizando líquido iônico como aditivo. Revista Perspectiva (online), v. 39, p. 51-60-60, 2015.

9 APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de variância do planejamento fatorial 3^2 para a atividade de esterificação e rendimento dos aerogéis imobilizados

	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor Fcalc
AE (U/g)	Regressão	323938,57	2	161969,28	75,85
	Resíduo	51246,61	24	2135,28	
	Total	375185,18	26		
R (%)	Regressão	1598780,41	2	799390,21	47,00
	Resíduo	408162,47	24	17006,77	
	Total	2006942,88	26		

AE (U/g): atividade de esterificação; R(%) rendimento.

APÊNDICE B – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t obtidos no Planejamento Fatorial 3² para a secagem da CALB imobilizada em sílica aerogel

		Coeficiente de			
		regressão	Erro padrão	t	p
AE (U/g)	Média	205,27	8,89	23,08	0,000
	X ₁ (L)	79,42	10,89	7,29	0,000
	X ₂ (L)	-108,11	10,89	-9,93	0,000
R (%)	Média	296,77	25,10	11,82	0,000
	X ₁ (L)	164,87	30,74	5,36	0,000
	X ₂ (L)	-248,27	30,74	-8,08	0,000

X₁: Temperatura (°C); X₂: Pressão (bar)

APÊNDICE C – Análise de variância do DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo

	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F_{calc}
Xerogel	Regressão	281102,57	5,00	56220,51	22,31
	Resíduo	12598,91	5,00	2519,78	
	Falta de ajuste	12475,77	3,00	4158,59	
	Erro Puro	123,14	2,00	61,57	
	Total	293701,48	10,00		
Aerogel	Regressão	69144,06	5,00	13828,81	24,25
	Resíduo	2851,33	5,00	570,27	
	Falta de ajuste	2827,21	3,00	942,40	
	Erro Puro	24,12	2,00	12,06	
	Total	71995,39	10,00		

APÊNDICE D – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t obtidos no DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo

		Coeficiente de			
		regressão	Erro padrão	t	p
Xerogel	Média	540,07	4,53	119,22	0,000
	X ₁ (L)	-80,20	2,78	-28,87	0,001
	X ₁ (Q)	-155,88	3,32	-47,02	0,000
	X ₂ (L)	-93,07	2,78	-33,50	0,000
	X ₂ (Q)	-88,66	3,32	-26,74	0,001
	X ₁ . X ₂	-57,33	3,92	-14,61	0,004
Aerogel	Média	247,40	2,00	123,40	0,000
	X ₁ (L)	51,15	1,23	41,60	0,000
	X ₁ (Q)	-55,46	1,47	-37,80	0,000
	X ₂ (L)	12,39	1,23	10,07	0,009
	X ₂ (Q)	-83,25	1,47	-56,74	0,000
	X ₁ . X ₂	-23,79	1,74	-13,70	0,005

X₁: Enzima (g/mL); X₂: Aditivo (g/mL)

APÊNDICE E – Análise de variância do DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel com o uso de diferentes líquidos iônicos como aditivo

	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F_{calc}
C ₄	Regressão	27199,96	5,00	5439,99	8,88
	Resíduo	3061,35	5,00	612,27	
	Falta de ajuste	3059,99	3,00	1020,00	
	Erro Puro	1,37	2,00	0,68	
	Total	30261,31	10,00		
C ₈	Regressão	253536,83	5,00	50707,37	56,30
	Resíduo	4502,99	5,00	900,60	
	Falta de ajuste	4464,83	3,00	1488,28	
	Erro Puro	38,16	2,00	19,08	
	Total	258039,82	10,00		
C ₁₆	Regressão	102625,46	5,00	20525,09	45,23
	Resíduo	2269,16	5,00	453,83	
	Falta de ajuste	2252,46	3,00	750,82	
	Erro Puro	16,70	2,00	8,35	
	Total	104894,62	10,00		

APÊNDICE F – Coeficiente de regressão, erro padrão, valores de p e t obtidos no DCCR da imobilização da lipase CALB em xerogel com o uso de diferentes líquidos iônicos como aditivo

		Coeficiente de			
		regressão	Erro padrão	t	p
C ₄	Média	140,98	0,48	295,53	0,000
	X ₁ (L)	32,94	0,29	112,59	0,000
	X ₁ (Q)	21,21	0,35	60,76	0,000
	X ₂ (L)	42,54	0,29	145,40	0,000
	X ₂ (Q)	20,56	0,35	58,88	0,000
	X ₁ . X ₂	-9,05	0,41	-21,91	0,002
C ₈	Média	476,59	2,52	188,97	0,000
	X ₁ (L)	129,92	1,55	83,99	0,000
	X ₁ (Q)	-92,04	1,85	-49,87	0,000
	X ₂ (L)	30,68	1,55	19,84	0,003
	X ₂ (Q)	-127,01	1,85	-68,82	0,000
	X ₁ . X ₂	-25,00	2,18	-11,45	0,008
C ₁₆	Média	347,69	1,67	208,42	0,000
	X ₁ (L)	33,06	1,02	32,31	0,001
	X ₁ (Q)	-76,95	1,22	-63,03	0,000
	X ₂ (L)	11,77	1,02	11,50	0,007
	X ₂ (Q)	-120,81	1,22	-98,96	0,000
	X ₁ . X ₂	-9,72	1,44	-6,73	0,021

X₁: Enzima (g/mL); X₂: Aditivo (g/mL)