

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS  
MISSÕES – URI- ERECHIM**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ANGELA ANTUNES**

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica B* IN SITU EM MATRIZ  
HIDROFÓBICA DE XEROGEL E SONOGEL USANDO TMOS COMO  
PRECURSOR DA SÍLICA COM DIFERENTES ADITIVOS**

**ERECHIM, RS – BRASIL**

**MARÇO DE 2019**

Angela Antunes

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica B* IN SITU EM MATRIZ  
HIDROFÓBICA DE XEROGEL E SONOGEL USANDO TMOS COMO  
PRECURSOR DA SÍLICA COM DIFERENTES ADITIVOS

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. Dra. Jamile Zeni

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO DE 2019

Angela Antunes

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica B* IN SITU EM MATRIZ  
HIDROFÓBICA DE XEROGEL E SONOGEL USANDO TMOS COMO  
PRECURSOR DA SÍLICA COM DIFERENTES ADITIVOS

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. Dra. Jamile Zeni

Data da defesa 21/03/2019

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Geciane Backes Toniazzo  
Membro da Banca (URI-Erechim)

---

Prof. Dra. Jamile Zeni  
(Orientadora)

---

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

---

Prof. Dra. Aline Matuella Moreira Ficanha  
Membro da Banca (CESURG)

---

Prof. Dra. Clarissa Dalla Rosa  
Membro da Banca (UFFS- Erechim)

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO DE 2019

A636i Antunes, Angela

Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B in situ em matriz hidrofóbica de xerogel e sonogel usando tmos como precursor da sílica com diferentes aditivos / Angela Antunes. - 2019.

90 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

“Orientação: Dr, Rogério Marcos Dallago; Dra. Jamile Zeni”

1. Enzima 2. Alcoolpolivinílico 3. Polietilenoglicol 4. Técnica sol-gel  
I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

*Seja digno e correto em todas as circunstâncias. Não se preocupe com os equívocos alheios. Cada qual dará conta de seus atos a sua própria existência. Sua tarefa consiste em melhorar-se sempre. Para isso você nasceu.*

*(Chico Xavier)*

*As pessoas boas merecem nosso amor, as más precisam dele.*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, aos meus anjos e guias protetores. Que me guiaram e mostraram – me sempre o caminho do bem, do amor e da sabedoria.

Á minha família, ao meu pai Vilson, que sempre dedicou a mim, todos os cuidados de um pai zeloso e amoroso, e que mesmo muitas vezes longe, sempre esteve por perto em pensamento, me apoiando e torcendo pelas minhas conquistas. Te amo Pai!

A ela, minha mãezinha Genaire, que por forças maiores, não está mais aqui fisicamente, mas que permanece em meus pensamentos e no coração eternamente. É a ela que dedico mais essa etapa concluída de minha vida. Ela é a luz que me guia e ampara em todos esses anos da minha caminhada "solitária". Gratidão pela vida! Te Amo!

Ao meu namorado Renato, que a tantos anos me acompanha, antes como amigo, hoje como parceiro de vida. Gratidão pelo carinho, pelo companheirismo e amor.

A minha amiga-irmã Aline Ficanha, por ser minha parceira nesta jornada. Gratidão Lanis, pelo carinho, amizade e orientação. Seguimos juntas e evoluindo!

Ao Professor Rogério Marcos Dallago, por ser mais que um orientador, por ser um amigo, conselheiro, educador, aquele que preocupa-se com seu bem estar, aquele que te tem como filha. Obrigada por esses 14 anos dessa caminhada juntos!

A Professora Jamile Zeni, a quem aprendi a gostar e admirar, como pessoa e como profissional. Gratidão!

A minha companheira de laboratório e de vida Alana, pela amizade, pelos conselhos e carinho. Gratidão "grandona"!

Aos bolsistas de iniciação científica (meus filhos), Leonardo, Thais e Mateus por serem sempre prestativos, dedicados e competentes na realização de todos os trabalhos que lhes era imposto. Obrigada crianças pela ajuda!

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

**RESUMO:** A obtenção das enzimas lipases imobilizadas é um desafio na biotecnologia atual, pois, possuem um papel importante em diversos processos e produtos biotecnológicos. 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 e, o presente trabalho tem por objetivo imobilizar a lipase CALB em sílica xerogel e sonogel obtida pela técnica sol-gel na presença de diferentes aditivos. Os suportes imobilizados foram preparados utilizando como precursor de sílica o tetrametilortossilicato. A CALB e os diferentes aditivos “*in situ*” foram adicionados no processo de formação do suporte. Foram utilizados como aditivo o polietilenoglicol 1500 e álcool polivinílico. Para otimizar o processo de imobilização com os diferentes aditivos, foi proposto um DCCR completo. Além do uso de aditivos, foram testados dois métodos de secagem: por evaporação e por ultrassom. Para os suportes otimizados foram realizados o estudo da estabilidade operacional e de armazenagem. No capítulo 4 do presente trabalho, foi realizado um estudo para determinar a melhor quantidade de água a ser usado para formação do suporte para imobilização. Foi adotada a metodologia de planejamento experimental 2<sup>3</sup> para selecionar as melhores condições de secagem. As variáveis independentes foram volume de água (12 – 18 mL), concentração de enzima (0,18 – 0,54 mL), e concentração de polietilenoglicol (1 – 2 mL) e a variável dependente foi a atividade de esterificação na síntese do oleato de etila. O estudo das variáveis no processo de secagem para obtenção tanto do xerogel quanto do sonogel imobilizado demonstrou-se uma etapa importante. Os resultados do planejamento experimental demonstram que as maiores AE foram nas condições nos níveis do ponto central tanto o xerogel quanto para o sonogel com uso de aditivo polietilenoglicol. O modelo matemático para o processo foi validado e os pontos ótimos determinados foram 15,25 mL de água, 0,4 g/mL de enzima e 0,15 g/mL de aditivo e 20 Hz da frequência ultrassônica e 30°C de temperatura de reação respectivamente. A partir desses resultados, realizou-se experimentos com a finalidade de verificar a estabilidade operacional, de armazenagem e térmica dos suportes imobilizados. Também foram realizadas a otimização e estudo da influência das variáveis aditivo álcool polivinílico e da concentração de enzima na AE do xerogel imobilizado. O modelo matemático para o processo foi validado e os pontos ótimos determinados foram de 3,61% de porcentagem do aditivo em relação ao peso total do suporte e 1,22 mL de concentração de enzima. Quanto a estabilidade operacional, o xerogel com polietilenoglicol, independente do aditivo utilizado, apresentou maior número de ciclos de utilização em comparação ao sonogel com polietilenoglicol e do xerogel com álcool polivinílico. De acordo com o exposto, o melhor desempenho de atividade de esterificação no estudo da estabilidade de armazenagem se deu no xerogel e sonogel com polietilenoglicol, em comparação ao xerogel com álcool polivinílico. Já para o estudo de estabilidade térmica o xerogel com o uso de polietilenoglicol obteve-se melhores resultados para K<sub>d</sub> e tempo de meia vida.

**Palavras-chave:** enzima; álcool polivinílico; polietilenoglicol; técnica sol-gel.

**ABSTRACT:** Obtaining immobilized lipase enzymes is a challenge in today's biotechnology, since they play an important role in several processes and biotechnological products. In addition, its application depends on efficient immobilization techniques and the use of appropriate support that maintains enzymatic stability. Different techniques can be used to immobilize enzymes. The aim of the present work is to immobilize CALB lipase in silica xerogel and sonogel obtained by the sol-gel technique in the presence of different additives. The immobilized supports were prepared using tetramethylorthosilicate (TMOS) as the silica precursor. The CALB and the different additives "in situ" were added in the process of forming the support. PEG 1500 and PVA were used as additives. To optimize the immobilization process with the different additives, a complete DCCR was proposed. In addition to the use of additives, two drying methods were tested: by evaporation and by ultrasound. For the optimized supports, the study of the operational and storage stability was carried out. In chapter 4 of the present work, a study was carried out to determine the best water content to be used for support formation. The experimental planning methodology 23 was adopted to select the best drying conditions. The independent variables were water volume (12 - 18 mL), enzyme concentration (0.18 - 0.54 mL), and PEG concentration (1-2 mL) and the dependent variable was the esterification activity (AE) in the synthesis of ethyl oleate. The study of the variables in the drying process to obtain both xerogel and immobilized sonogel was an important step. The results of the experimental design demonstrate that the highest AE were in the conditions at the central point levels both xerogel and sonogel with use of PEG additive. The mathematical model for the process was validated and the optimal points determined were 15.25 mL of water, 0.4 g / mL of enzyme and 0.15 g / mL of additive and 20 Hz of the ultrasonic frequency and 30 ° C of reaction temperature respectively. From these results, experiments were carried out with the purpose of verifying the operational, storage and thermal stability of the immobilized substrates. The optimization and study of the influence of the PVA additive and enzyme concentration on the AE of the immobilized xerogel were also performed. The mathematical model for the process was validated and the optimum points determined were 3.61% of the additive relative to the total weight of the support and 1.22 mL of enzyme concentration. As regards the operational stability, the xerogel with PEG, independent of the additive used, showed a greater number of cycles of use compared to sonogel with PEG and xerogel with PVA. Accordingly, the best performance of AE in the study of storage stability was in xerogel and sonogel with PEG, compared to xerogel with PVA. For the thermal stability study, the xerogel with the use of PEG was obtained better results for Kd and half-life.

**Keywords:** enzyme; polyvinyl alcohol; polyethylene glycol; sol-gel technique.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO I .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>19</b> |
| 1.1 OBJETIVOS .....   | 20        |
| 1.1.1 Geral .....   | 20        |
| 1.1.2 Específico .....  | 20        |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1. LIPASE DE CANDIDA ANTÁCTICA B (CALB).....  | 22        |
| 2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....   | 25        |
| 2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....   | 28        |
| 2.3.1 Técnica sol-gel.....  | 28        |
| 2.3.1.1 Xerogel .....   | 31        |
| 2.3.1.2 Sonogel.....  | 32        |
| 2.4 USO DE ADITIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO .....   | 33        |
| 2.4.1. Polietilenoglicol.....   | 34        |
| 2.4.2 Álcool Polivinílico.....  | 35        |
| <b>CAPÍTULO III .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>SINTESE DOS IMOBILIZADOS XEROGEL E SONOGEL.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>38</b> |
| 3.1 IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTE XEROGEL .....   | 38        |
| 3.1.1.1 Enzima e materiais químicos utilizados .....  | 38        |
| 3.1.1.2 Avaliação da formação do suporte a partir de diferentes concentrações de água .....                                       | 38        |
| 3.1.1.3 Avaliação da formação do suporte a partir de diferentes concentrações de água .....                                       | 39        |
| 3.1.1.3 Influência da concentração de PEG e de enzima e volume de água na atividade de esterificação do imobilizado .....         | 40        |
| 3.1.1.4 Influência da porcentagem de aditivo (PVA) e da concentração de enzima na atividade de esterificação do imobilizado ..... | 40        |
| 3.2 IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTE SONOGEL .....   | 40        |
| 3.2.1.1 Processo de Imobilização .....  | 40        |
| 3.2.1.2 Tempo de contato (Ultrassom) .....  | 41        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.1.3 Avaliação da influência da temperatura de secagem e da frequência do banho ultrassônico na atividade de esterificação do imobilizado ..... | 41        |
| 3.2.1.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....   | 41        |
| 3.2.1.5. Determinação do rendimento de imobilização .....  | 42        |
| 3.2.1.6. Determinação da atividade de esterificação .....  | 42        |
| 3.2.1.7. Avaliação da estabilidade operacional .....   | 43        |
| 3.2.1.8 Estabilidade de Armazenamento .....  | 43        |
| 3.2.1.9 Estabilidade térmica .....   | 44        |
| 3.2.1.10 Análise estatística .....   | 44        |
| <b>CAPÍTULO IV.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>   | <b>45</b> |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 46        |
| 4.1 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM XEROGEL UTILIZANDO PEG COMO ADITIVO .....  | 46        |
| 4.1.1 Avaliação da formação do suporte a partir de diferentes volumes de solução.....  | 46        |
| 4.1.2 Influência da concentração de PEG e de enzima e volume de água na atividade de esterificação do imobilizado .....                            | 49        |
| 4.1.3 Estabilidade operacional.....  | 53        |
| 4.1.4 Estabilidade de armazenamento .....  | 54        |
| 4.1.5 Estabilidade térmica .....   | 57        |
| 4.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM XEROGEL UTILIZANDO PVA COMO ADITIVO .....  | 59        |
| 4.2.1 Influência da porcentagem de aditivo e da concentração de enzima na atividade de esterificação do imobilizado .....                          | 59        |
| 4.2.2. Estabilidade operacional.....   | 63        |
| 4.2.3 Estabilidade de armazenamento .....  | 64        |
| 4.2.4 Estabilidade térmica .....   | 66        |
| 4.3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SONOGEL COM USO DE PEG .....   | 67        |
| 4.3.2 Influência da temperatura de secagem e da potência do banho ultrassônico na atividade de esterificação do imobilizado .....                  | 69        |
| 4.3.3. Estabilidade operacional.....   | 72        |
| 4.3.4 Estabilidade de armazenamento .....  | 74        |
| 4.3.5 Estabilidade térmica .....   | 76        |
| 4.3.6 Considerações Parciais .....   | 77        |
| <b>CAPÍTULO VI.....</b>  | <b>78</b> |
| <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>78</b> |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>  | <b>79</b> |
| 5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....  | 80        |
| 5.2 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....  | 81        |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Modelo estrutural de $\alpha/\beta$ hidrolases.....   | 22 |
| Figura 2. Representação em fitas da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> B com ênfase no seu sítio catalítico.....                                 | 23 |
| Figura 3. Representação esquemática da passagem de um sol para um gel. O processo tridimensional está representado bidimensionalmente.....                                    | 30 |
| Figura 4. Desenvolvimento da técnica sol-gel .....  | 31 |
| Figura 5. <i>Candida antarctica</i> B após o processo de imobilização pela técnica sol-gel usando TMOS como precursor da sílica.....  | 39 |
| Figura 6. Atividade de esterificação (AE) dos biocatalisadores imobilizados em xerogel com diferentes volumes de água, com e sem o uso do PEG 1500 .....                      | 46 |
| Figura 7. Rendimento de imobilização (RI dos biocatalisadores imobilizados em xerogel com diferentes volumes de água, com e sem o uso do PEG 1500 .....                       | 48 |
| Figura 8. Curva de contorno para a atividade de esterificação em função das variáveis água e enzima (a), aditivo e água (b) e enzima e aditivo peg (c), respectivamente. .... | 52 |
| Figura 9. Reuso da enzima imobilizada em xerogel, com e sem PEG 1500.....   | 53 |
| Figura 10. Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada em xerogel, com e sem PEG 1500, em temperatura ambiente e refrigerador.....  | 55 |
| Figura 11. Curva de contorno para a atividade de esterificação em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima.....                             | 62 |
| Figura 12. Reuso da enzima imobilizada em xerogel, com e sem adição de PVA. ....  | 63 |
| Figura 13. Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada em xerogel, com e sem adição de PVA, em temperatura ambiente e refrigerador. ....                                  | 64 |
| Figura 14. Atividade de esterificação do imobilizado em função do tempo de contato ultrassônico na formação de sonogel sem a presença de e com adição de PEG .....            | 68 |
| Figura 15. Curva de contorno para as variáveis frequência ultrassônica e temperatura da reação na imobilização em sonogel .....   | 72 |
| Figura 16. Reuso da enzima imobilizada em sonogel, com e sem PEG.....   | 73 |
| Figura 17. Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada em sonogel, com e sem PEG, em temperatura ambiente e refrigerador. ....  | 74 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no DCCR 2 <sup>3</sup> completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em xerogel com presença de PEG.....  | 40 |
| Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no DCCR 2 <sup>2</sup> completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em xerogel com presença de PVA .....   | 40 |
| Tabela 3. Variáveis e níveis utilizados no DCCR 2 <sup>2</sup> completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em sonogel com presença de PEG .....   | 41 |
| Tabela 4. Matriz do DCCR 2 <sup>3</sup> em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica na atividade de esterificação do mobilização em xerogel com adição de PEG .....   | 49 |
| Tabela 5. Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de t e p do DCCR 2 <sup>3</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica para a atividade de esterificação.....       | 51 |
| Tabela 6. Análise de variância dos resultados obtidos no DCCR 2 <sup>3</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis volume de água (X <sub>1</sub> ), concentração de enzima (X <sub>2</sub> ) e PEG (X <sub>3</sub> ).....    | 52 |
| Tabela 7. Constante de desativação térmica (K <sub>d</sub> ), os coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) e tempos de meia vida (t <sub>1/2</sub> ) da lipase CALB livre e imobilizada em xerogel com e sem PEG 1500 .....           | 57 |
| Tabela 8. DCCR 2 <sup>2</sup> em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima na atividade de esterificação do imobilizado em xerogel .....  | 59 |
| Tabela 9. Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de t e p do DCCR 2 <sup>2</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima para a atividade de esterificação. .... | 61 |
| Tabela 10. Análise de variância dos resultados obtidos no DCCR 2 <sup>2</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima .....   | 61 |
| Tabela 11. Constante de desativação térmica (K <sub>d</sub> ), os coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) e tempos de meia vida (t <sub>1/2</sub> ) da lipase CALB livre e imobilizada em xerogel com e sem PVA .....               | 66 |
| Tabela 12. Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica na atividade de esterificação do mobilização em sonogel. ....  | 69 |
| Tabela 13. Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de t e p do DCCR 2 <sup>2</sup> da imobilização em sonogel em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica para a atividade de esterificação.....      | 71 |

Tabela 14. Análise de variância dos resultados obtidos no DCCR 2<sup>2</sup> da imobilização em sonogel em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica.... 71

Tabela 15. Constante de desativação térmica (Kd), os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) e tempos de meia vida (t<sub>1/2</sub>) da lipase CALB imobilizada em sonogel com e sem PEG 1500 ..... 76

## ABREVIATURAS

CalB: Lipase de *Candida antarctica* B

PEG: Polietilenoglicol

PVA: Álcool polivinílico

TMOS: Tetrametilortosilicato

°C: graus Celsius;

μL: microlitro;

μmol: micromol;

AE: Atividade de esterificação;

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

CTMABr: Brometo de cetil-trimetilamônio;

DCCR: Delineamento composto central rotacional;

DPad: desvio padrão;

NC-IUBMB: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology;

R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlação;

RI: Rendimento de imobilização

RPM: Rotações por minuto;

tf: Tempo final (min);

ti: Tempo inicial (min);

U: Unidade de atividade suporte imobilizado (g);

V: Volume de amostra (mL);

Va: Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

Vb: Volume de NaOH gasto na titulação do ensaio controle (mL);

Vc: Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL);

Vf: Volume final de meio reacional (mL);

## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica B IN SITU* EM MATRIZ HIDROFÓBICA DE XEROGEL E SONOGEL USANDO TMOS COMO PRECURSOR DA SÍLICA COM DIFERENTES ADITIVOS

### Por que?

- A técnica de imobilização apresenta-se como uma alternativa para contornar algumas limitações de alguns biocatalisadores, a mesma possibilitará uma maior estabilidade à enzima em estudo;
- A técnica de sol-gel é um método de imobilização vantajoso e de fácil manuseio, além, de reter a enzima no interior da matriz ou em sua superfície conferindo estabilidade mecânica e bioquímica superior às técnicas convencionais;
- Dependendo da técnica utilizada para a preparação, o gel pode receber as seguintes nomenclaturas: alcoogel, sonogel, xerogel, aerogel ou criogel.
- A utilização de aditivos para estabilizar enzimas dentro da matriz sol-gel como açúcares, aminoácidos, polióis e agentes tensoativos têm sido utilizados para aumentar a atividade e estabilidade de várias enzimas imobilizadas;
- Cabe salientar que os aditivos não ativam a enzima, apresentam um efeito estabilizante que previne a desativação da enzima quando de sua interação com o suporte.

### Quem já fez?

- Até o momento não há relatos na literatura sobre imobilização da enzima lipase (CAL B) em suporte xerogel e sonogel utilizando TMOS precursor da sílica;
- Até o momento não há relatos na literatura sobre imobilização da enzima lipase (CAL B) em suporte sonogel utilizando PEG e PVA como aditivos para o processo de síntese enzimática.

## Hipóteses

- É possível imobilizar a enzima CALB em suporte de xerogel e sonogel usando TMOS como precursor da sílica?
- A enzima se mantém ativa após o processo de imobilização?
- A atividade enzimática, a estabilidade operacional, de armazenamento e térmica da lipase são mantidas após a imobilização?

## Métodos Experimentais

- Avaliar com teste preliminares os processos de imobilização do xerogel e sonogel com os diferentes aditivos (PEG e PVA);
- Estudar o processo de otimização dos diferentes suportes de imobilização;
- Estudar o processo de interação enzima-aditivos;

## Respostas

- Avaliar as melhores condições para funcionalização do suporte;
- Determinar quais as condições experimentais proporcionam maior atividade enzimática após a imobilização;

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos importantes utilizados em diversos tipos de reações. São responsáveis por acelerarem e/ou induzirem reações químicas. Este fato ocorre por meio da redução da energia de ativação, ou seja, ocorre a diminuição da energia necessária para a realização da reação química.

Dentre as características das enzimas uma das principais é a sua especificidade ao substrato, no qual catalisa apenas um tipo de reação ou um pequeno grupo de reações que possuam características semelhantes.

O uso de lipase como catalisadores de reações típicas da indústria química é cada vez mais aplicado, devido sua capacidade em modificar a velocidade de uma reação sem alterar o produto final.

Entretanto, as enzimas na sua forma livre possuem um curto tempo de vida, o que limita a sua utilização biotecnológica, as quais podem ser afetadas por diversos fatores, tais como temperatura, pH, que podem resultar na sua desnaturação, perder assim o seu poder catalítico e impedir o seu reuso.

Tais problemas podem ser contornados ou amenizados com métodos de imobilização enzimática. O estudo de métodos de imobilização de enzimas é importante, pois, podem melhorar a estabilidade e desta forma reduzir a quantidade de material requerido em muitos processos. Além disso, pode-se prolongar o tempo de vida e aumentar o potencial para reutilização das moléculas proteicas. Diversos métodos de imobilização são propostos pela literatura, como por exemplo, a técnica sol-gel, que se destaca por ser bastante promissora.

O processo para formação da matriz hidrofóbica para imobilização possui diversas variáveis que determinam as características finais dos materiais, tais como o grupo silanol precursor da sílica, o tempo de hidrólise e condensação e a homogeneidade do produto.

Contudo, este processo apresenta alguns inconvenientes pois durante a etapa de formação do gel, a enzima pode perder sua estabilidade e seu poder catalítico. Desta forma, é comum o uso de aditivos a fim de minimizar os efeitos negativos causados pelas interações químicas na formação do suporte. Além disso, alguns aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita sua utilização para imobilizar enzimas.

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

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 GERAL**

O objetivo geral deste trabalho foi imobilizar a lipase de *Candida antarctica* do tipo B em xerogel e sonogel obtido pelo método sol-gel com tetrametilortosilicato (TMOS) como precursor da sílica utilizando polietilenoglicol e álcoolpolivinílico.

### **1.1.2 ESPECIFICO**

- Estudar o processo de imobilização de xerogel e sonogel, utilizando o tetrametilortosilicato (TMOS) como precursor da sílica para a imobilização;
- Avaliar diferentes aditivos sendo eles: Polietilenoglicol (PEG) e Álcool Polivinílico (PVA), no processo de imobilização.
- Otimizar o processo de imobilização através de planejamento experimental para aditivos utilizados neste estudo (PEG e PVA)
- Determinar o rendimento de imobilização para os diferentes suportes de estudo (xerogel e sonogel);
- Avaliar a estabilidade operacional, de armazenamento e estabilidade térmica do imobilizado e comparar a influência dos diferentes aditivos (PEG e PVA).

## **CAPÍTULO II**

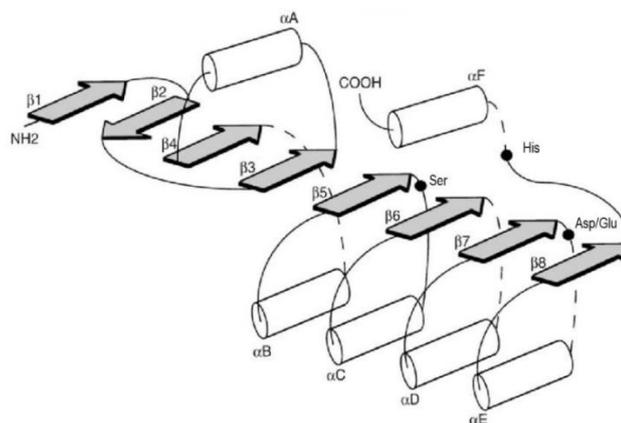
### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta etapa do trabalho será apresentada uma breve revisão da literatura sobre lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL B), imobilização enzimática, suportes para imobilização (sonogel e xerogel) e aditivos para imobilização (polietilenoglicol, álcool polivinílico).

### 2.1. LIPASE DE *Candida antarctica* DO TIPO B

As lipases grupo apresentam em sua estrutura tridimensional um padrão conformacional comum, com dobramento do tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase cujo núcleo central contém oito fitas  $\beta$  que se encontram conectadas por seis  $\alpha$ -hélices. Na Figura 1 as  $\alpha$ -hélices são representadas pelos cilindros e as fitas  $\beta$  pelas setas planas. Ademais, os pontos preenchidos em preto representam as posições topológicas dos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica, localizada na extremidade C-terminal da fita  $\beta 5$  (UPPENBERG *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999).



**Figura 1. Modelo estrutural de  $\alpha/\beta$  hidrolases**

Fonte: Adaptado de Jaeger *et al.* (1999)

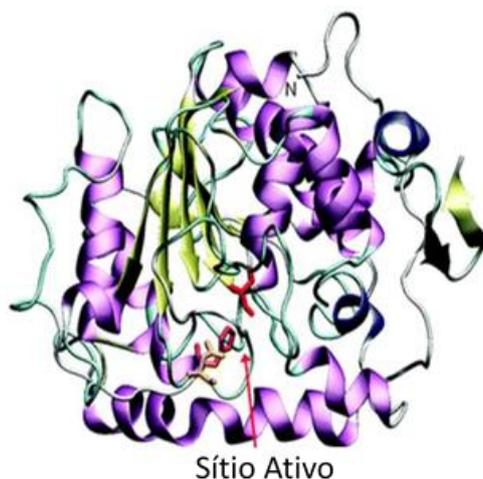
As lipases são enzimas que catalisam hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Atuam também em reações de esterificação e interesterificação entre outras, e são altamente seletivas, sendo biocatalisadores aplicáveis à produção de diversos produtos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

Segundo Granda *et al.* (2008) e Barbosa *et al.* (2011) as lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas.

A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e não requerem cofator (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005), apresentando temperatura ótima entre 30 e 60°C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (MACRAE e HAMMOND, 1985, BATISTELLA, 2012; FREITAS, 2006), sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (KIRK e CHRISTENSEN, 2002; SHARMA *et al.*, 2001).

As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas. Seu ponto isoelétrico (PI) varia em uma faixa de pH entre 3,6 e 7,6 e a maioria delas possui PI (ponto isoelétrico) em pH entre 4 e 5.

A ativação catalítica, frequentemente necessária em lipases, ocorre através do movimento de uma alça constituída por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (*lid*), que é uma estrutura de  $\alpha$ -hélice que recobre o sítio ativo. Em meio aquoso, o sítio catalítico permanece coberto por esta tampa, que o isola do meio de reação. Na interface lipídio/água, a alça se move expondo o sítio catalítico, o que favorece a ligação com o substrato (lipídio) e, assim, a atividade catalítica aumenta drasticamente. Este mecanismo é chamado de ativação interfacial. Entretanto, a presença da alça e a ativação interfacial não são características de todas as lipases e, ainda, a presença da alça em algumas lipases não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (THOMAS *et al.*, 2005). No caso da lipase de *Candida antarctica* B (CalB), ensaios de cristalografia demonstraram que esta assume uma conformação aberta ativa apenas com um canal hidrofóbico exposto ao acesso do solvente (UPPENBERG *et al.*, 1994). A estrutura tridimensional da CalB está ilustrada na Figura 2, em que a localização do sítio catalítico encontra-se em destaque.



**Figura 2. Representação em fitas da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* B com ênfase no seu sítio catalítico.**

Fonte: Adaptado de IUBMB (2019)

A pesquisa nesta área busca a descoberta de enzimas mais eficientes que as atuais, com atividades para novos compostos alvo, além de novos suportes sólidos, capazes de sustentar a atividade enzimática em meio orgânico. Neste contexto, ressalta-se a reutilização de enzimas imobilizadas, uma excelente abordagem para química verde, além de possibilidade de redução do custo do processo e da quantidade necessária desses biocatalisadores, em geral de alto valor agregado (ANDRADE *et al.*, 2010).

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; FICANHA *et al.*, 2015). A lipase CAL B tem sido estudada para potenciais aplicações na indústria alimentícia, de detergente, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e oleoquímica (HASAN *et al.*, 2006).

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).

A principal aplicação industrial da CAL B na forma livre ou imobilizada são: produção de compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica (STRAATHOF *et al.*, 2002); alimentos e fármacos (CASTRO *et al.*, 2004); produção de ésteres usados na indústria de aromas (BRÍGIDA *et al.*, 2008; LOZANO *et al.*, 2002); síntese de oleato de cetila (aplicado em indústrias de cosméticos) e biodiesel (SILVA *et al.*, 2012); síntese de lactato de butila (éster utilizado em indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica por possuir propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes) (PIROZZI e GRECO, 2004); síntese de ésteres de vitaminas (a fim de torná-las solúveis em óleo para adição

em produtos alimentícios) (MAUGARD e LEGOY, 2000) e outras como esterificação de açúcares e glicidol (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2003; PALOMO *et al.*, 2005).

A CALB apresenta potenciais aplicações na indústria alimentícia, de detergente, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e oleoquímica (HASAN *et al.*, 2006).

Contudo, o uso dessa enzima na forma livre apresenta limitações para aplicações industriais, pois são moléculas complexas, altamente sensíveis e sua exposição a determinadas condições como temperaturas extremas ou solventes orgânicos, pode conduzir à desnaturação e à perda concomitante de atividade, bem como a impossibilidade de recuperação e reutilização.

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

## **2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador, passível de recuperação, com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros (CRUZ JÚNIOR, 2007).

A atividade e funcionalidade das enzimas imobilizadas estão ligadas à manutenção da integridade da conformação terciária e em particular do sítio ativo da enzima (ABDELMAJEED *et al.*, 2012).

Os processos de imobilização devem ser métodos controlados, não agressivos, que respeitem a estrutura nativa da proteína e, além disso, as ligações formadas entre a enzima

e o suporte devem excluir os aminoácidos do sítio ativo envolvidos diretamente na reação catalítica (BRENA *et al.*, 2013)

As enzimas podem ser imobilizadas sobre uma ampla variedade de suportes naturais ou sintéticos, a seleção do suporte e/ou a técnica depende da natureza da enzima, do substrato e da aplicação (BUGA *et al.*, 2010).

Fajardo-Ochoa *et al.* (2011) relataram que as enzimas imobilizadas apresentam várias vantagens em comparação com a enzima livre, tais como:

- a) permitem um uso contínuo e controle das concentrações de proteínas empregadas;
- b) melhoram a estabilidade e atividade da enzima em função do pH e da temperatura;
- c) aumentam a eficiência do sistema;
- d) permitem a recuperação e reutilização do biocatalisador imobilizado, diminuindo os custos do processo.

Elas podem ser aplicadas tanto em catálise heterogênea como também em métodos analíticos, como adsorventes seletivos de proteína, como micro-dispositivo para recuperação controlada de proteínas entorpecentes ou mesmo como ferramenta fundamental na química de proteínas na fase sólida (CAO *et al* 2009).

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e, frequentemente, inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização (CARVALHO *et al.*, 2013).

Além do tipo de imobilização, vários parâmetros importantes devem ser analisados para a escolha do suporte como: a estabilidade química e física, o caráter hidrofóbico/hidrofílico, a capacidade de ligação com a enzima (SILVA *et al.*, 2009).

Segundo Abdelmajeed *et al.* (2012), a imobilização de enzimas é uma técnica valiosa, pois permite obter derivados enzimáticos facilmente reutilizáveis, com maiores tempos de meia vida e menor degradação; tem-se um método simples de controlar a velocidade e o período de início e término da reação, além de auxiliar na prevenção da contaminação do substrato com os compostos enzima/proteína ou de outro tipo, o que diminui os custos de purificação.

No que diz respeito à imobilização de lipase de *Candida antarctica* tipo B, considerando que esta é uma das poucas lipases que não sofre o fenômeno de ativação

interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), tem-se observado que a imobilização em suportes hidrofóbicos não apresentam hiper-ativação da enzima imobilizada.

Afim de melhorar o aproveitamento e utilização das enzimas livres, uma opção de contornar os possíveis obstáculos para os processos industriais, a imobilização enzimática vem como uma solução vantajosa a ser empregada.

## 2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

### 2.3.1 Técnica sol-gel

O processo sol-gel é usado para a fabricação de vidro e materiais cerâmicos, em que a solução (sol) evolui gradualmente para a formação de um gel como rede que contém um líquido e de fase sólida (HENCH e WEST, 1990). Técnicas de sol-gel tornaram-se muito populares recentemente, devido à sua homogeneidade química elevada, temperaturas de processamento baixas, e a possibilidade de controlar o tamanho e a morfologia das partículas. Os materiais derivados de sol-gel proporcionam excelentes matrizes para uma variedade de compostos orgânicos e compostos inorgânicos. As vantagens da tecnologia de sol-gel são usadas nos campos de sensores biomédicos, materiais de laser, e para aplicações de entrega de drogas sustentados (HENCH e WEST, 1990).

Desde então, o interesse pelo método sol-gel tem crescido no meio da comunidade científica. A maior motivação para tal interesse é o fato desta técnica proporcionar a obtenção de pós com elevada pureza e homogeneidade química e também as baixas temperaturas de processamento. Sol-gel é uma denominação aplicada a qualquer processo que envolve uma solução ou um sol que passa por uma transição chamada sol-gel. Nessa transição, a solução ou sol transforma-se em gel pelo estabelecimento de ligações químicas entre as partículas ou entre as espécies moleculares, levando à formação de uma rede sólida tridimensional (HIRATSUKA *et al* 1995).

A técnica de sol-gel foi utilizada para o fabrico de sensores, suportes de catalisadores, elementos ópticos, revestimentos e polímeros especiais. Entre os materiais que estão sendo encapsulados são biomoléculas tais como proteínas, enzimas e anticorpos catalíticos. Estas biomoléculas podem ser aprisionados em vidros de sílica robustos sob condições suaves, permitindo a manutenção da sua atividade química (BADJIC e KOSTIC, 1999). Há estudos relatados (ELLERBY *et al.*, 1992, GAO *et al.*, 2010) sobre a capacidade de proteínas e enzimas, tais como bovinos albumina de soro (BSA), mioglobina, hemoglobina, zinco superóxido de cobre e de glucose oxidase para se submeterem às necessárias alterações conformacionais para a ligação e a libertação do substrato.

O processo de sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois se trata de uma rota de síntese de materiais onde em um determinado momento ocorre a transição do sistema sol pra um sistema gel (HIRATSUKA *et al.*, 1995).

A imobilização da enzima no interior das matrizes produzidas pelo processo de sol-gel é uma técnica vantajosa, pois reserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

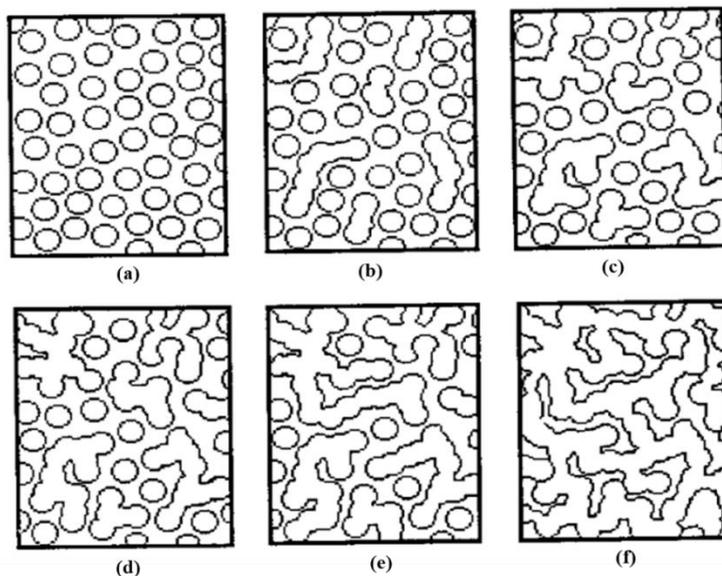
A produção de uma matriz sol-gel pode ser iniciada pela hidrólise parcial dos precursores (silicatos de alquilo ou alcoxisilanos) resultando em um oligômero. O oligômero presente é totalmente hidrolisado formando-se uma dispersão coloidal (sol), à qual é adicionada uma solução contendo o biocatalisador, 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).

Assim, o método sol-gel inclui uma variedade de técnicas que permitem a obtenção de composições de elevada pureza química com homogeneidade em nível molecular. Existem essencialmente 3 diferentes tipos de tecnologias sol-gel: a) sol-gel coloidal, b) sol-gel polimérico e c) sol-gel envolvendo a formação de uma resina polimérica. O primeiro objetivo em todos os processos sol-gel é preparação de uma solução precursora homogênea a partir da qual um gel semirígido pode ser isolado com um nível de homogeneidade atômica (Kakihana, 1996).

Para este estudo a técnica a ser utilizada é a formação de coloides os quais são formados pela dispersão e/ou pela formação de partículas carregadas ou não, com diâmetros típicos de 1-100 nm em um meio líquido. A união entre as partículas, pelo processo de crescimento e agregação, pode levar à desestabilização da dispersão coloidal, formando géis ou precipitados (ILER, 1979). A transição sol-gel começa com a formação de fragmentos sólidos agregados que crescem até que se estendam por todo o sol. A Figura 3 representa esquematicamente este processo.

Inicialmente o sistema é constituído por partículas coloidais (sol), que resultam da polimerização do monômero (a). Estas partículas se ligam formando pequenas cadeias ramificadas tridimensionais (b) e regiões de microgel, onde o índice de refração e a densidade são próximos aos da dispersão e, portanto, não decantam (c). O sistema passa a apresentar um comportamento elástico quando o crescimento destas regiões estruturadas atinge aproximadamente a metade do volume total, ou seja, a viscosidade tende ao infinito e o sol alcança o ponto de gel (d). A partir deste ponto as regiões

estruturadas crescem conjuntamente, culminando na formação de uma rede que ocupa todo o volume do sistema (e-f).



**Figura 3. Representação esquemática da passagem de um sol para um gel. O processo tridimensional está representado bidimensionalmente.**

Fonte: ILER, 1979

Estudos de sínteses que utilizam sistemas coloidais mostram que o pH, a temperatura, o tempo de envelhecimento e a natureza dos ânions da solução são determinantes do grau de homogeneidade dos géis e dos precursores cerâmicos preparados por esta rota (ZHANG *et al* 2010; BENNADJI *et al* 2010). Embora a complexidade do controle desses parâmetros dificulte a obtenção de precursores com homogeneidade elevada, este método tem como vantagem o baixo custo dos reagentes, a simplicidade da síntese e a possibilidade de obtenção dos produtos a temperaturas menores que a dos processos com pós reativos.

A Figura 4 mostra o processo de imobilização em xerogel ácido, básico e nucleofílico obtidos pela técnica de sol-gel



**Figura 4. Desenvolvimento da técnica sol-gel**

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

**Fonte:** HONAISSER, 2017

Dependendo da técnica utilizada para a preparação, o Gel pode receber as seguintes nomenclaturas: alcoogel, sonogel, xerogel, aerogel ou criogel. Para o presente trabalho dois desses géis serão avaliados.

### 2.3.1.1 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).

A secagem por evaporação normal da suspensão coloidal, provoca o surgimento de uma pressão capilar, levando ao encolhimento da rede do gel. Isto resulta na formação

do xerogel. Da própria palavra, “xero” significa secar, daí pode-se de maneira simples, assumir que xerogel é simplesmente um gel que foi seco sob condições normais de temperatura e pressão (BRINKER e SCHERER, 1990).

A estrutura de um xerogel é fortemente dependente das condições que prevalecem durante o processo de hidrólise. Por exemplo, silicatos catalizados através de base produzem géis que são granulares em textura e retém menos material orgânico. (BRINKER e SCHERER, 1990)

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) (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 (NH<sub>4</sub>OH) (BARRERA *et al.*, 2013); além do tempo de hidrólise e condensação, a homogeneidade do produto e a razão molar água:silano (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

### **2.3.1.2 Sonogel**

O processo sol-gel é um método de baixa temperatura, o que tem sido utilizado para preparar com êxito géis de silicato de hidrólise ácida ou básica, seguida por policondensação (VOLLET *et al.*, 2003). O procedimento relativamente baixa temperatura permitem a incorporação de um grande número de aditivos orgânicos e inorgânicos durante o processo de formação de vidro obtendo-se materiais com propriedades ópticas interessantes (BRINKER e SCHERER, 1990).

Alguns estudos sobre a evolução no tempo sobre o processo de agregação e o processo de envelhecimento (DA SILVEIRA *et al.*, 2014) foram realizadas em sonogéis. Na verdade, a literatura não é muito abundante de dados relativos às propriedades estruturais de sonogéis (VOLLET *et al.*, 2003).

## 2.4 USO DE ADITIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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).

#### **2.4.1. Polietilenoglicol**

Polietileno glicol PEG é um polímero sintético não-tóxico, solúvel em água, largamente empregado em processos biotecnológicos em indústrias químicas e biomédicas. 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.

Apesar de ser muitas vezes considerado um material inerte alguns estudos mostram que PEG pode influenciar fortemente a atividade enzimática.

Zanin e Moraes, 2011 propôs que a presença de PEG favorece a estabilidade de proteínas nativas devido à exclusão estérica (volume excluído) e hidratação preferencial das proteínas. O método de estresse osmótico mede mudanças no número de moléculas de água associadas às macromoléculas isoladas, quando estas sofrem mudanças conformacionais.

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

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

Soares *et al.* (2001; 2002; 2003), avaliaram diferentes tipos de aditivos considerando a atividade hidrolítica, bem como a estabilidade operacional de derivados imobilizados de lipase de *Candida rugosa* em sílica de porosidade controlada.

Entre os aditivos testados, o polietilenoglicol 1500 proporcionou um considerável aumento da atividade hidrolítica, além de reduzir a desativação da enzima e a utilização do PEG com menor massa molar aumenta significativamente o rendimento na recuperação da atividade enzimática da lipase de *Candida rugosa*, atingindo valores de 60 % (SOARES *et al.*, 2006).

Estudos utilizando PEG 1500 foram realizados por Ficanha *et al.* (2015) apresentaram resultados satisfatórios em relação a atividade de esterificação quando se adiciona o aditivo para a imobilização de CALB em xerogel.

#### **2.4.2 Álcool Polivinílico**

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero que tem ganhado destaque nos processos de obtenção de blendas para aplicações biotecnológicas devido a características como boa transparência, consistência macia, excelente resistência química e, principalmente, por sua biocompatibilidade (FEITOSA, 2008; ZAIN *et al.*, 2011). O PVA é obtido de forma indireta mediante a polimerização do acetato de vinila a poli(acetato de vinila) (PVAc) com posterior hidrólise a poli(álcool vinílico) na presença de hidróxido de potássio e metanol (FERNANDES, 2005). É um polímero solúvel em água, fato que se deve ao elevado teor de hidroxilas presentes na sua estrutura química que lhe confere um caráter hidrofílico, mediante a capacidade de formação de ligações de hidrogênio (CARAMORI *et al.*, 2014). O grau de hidrólise do PVA é uma grandeza representada

pela relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total de radicais ácido acético antes da hidrólise. Este parâmetro é de grande importância durante a determinação das propriedades deste polímero (BERGER *et al.*, 2004). Devido ao grande número de grupos hidroxila presentes na estrutura química do PVA o mesmo apresenta a capacidade de interagir com moléculas reticulantes, que geralmente são moléculas que possuem baixa massa molecular em relação à cadeia polimérica e que apresentam pelo menos dois grupos funcionais reativos que lhes permite estabelecer uma ponte entre as cadeias poliméricas (COSTA-JUNIOR; MANSUR, 2008).

O álcool polivinílico (PVA), também apresenta boas características para aplicação em imobilização de enzimas, devido a sua grande área de superfície, alta porosidade, estabilidade térmica, óptica e química (LIMA-BARROS *et al.*, 2002).

De acordo com Ingersoll e Bright (1997) a síntese do suporte começa com hidrólise do alcóxido de silício formando um produto hidroxilado e o álcool correspondente. O segundo passo é a condensação entre um grupo alcóxido não hidrolisado e uma hidroxila, ou entre duas hidroxilas apenas, formando uma mistura coloidal (sol). O último passo envolve policondensação entre os componentes dessa mistura coloidal e uma rede adicional (PVA) resultando em matriz híbrida porosa.

**CAPÍTULO III**  
**MATERIAIS E MÉTODOS**

**SINTESE DOS IMOBILIZADOS XEROGEL E SONOGEL**

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTE XEROGEL

#### 3.1.1.1 Enzima e materiais químicos utilizados

A lipase de *Candida antarctica* B (CAL B, Novozymes) foi imobilizada em sílica obtida pela técnica sol-gel. Os produtos químicos utilizados foram tetrametilortossilicato (TMOS, 99% Sigma–Aldrich) como precursor da sílica; etanolamina (98%, Sigma–Aldrich) como iniciador da reação de polimerização, brometo de cetil-trimetilamonio como agente direcionador da estrutura (CTMABr, 98% Sigma–Aldrich), Polietilenoglicol 1500 (Sigma–Aldrich) e água destilada.

#### 3.1.1.2 Avaliação da formação do suporte a partir de diferentes concentrações de água

A lipase de *Candida antarctica* B foi imobilizada *in situ* em uma matriz hidrofóbica obtida pelo método sol-gel. A metodologia utilizada para a preparação dos suportes foi adaptada da descrita por Macario *et al.* (2009). A presença e ausência do PEG 1500 na solução total também foi avaliada.

Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa de CTMABr (1,46 g/mL), mais 2 mL da solução de enzima e 1 mL de PEG 1500. Água destilada foi adicionada para alcançar o volume total desejado para o experimento, sendo que estes foram de 12, 15 e 18 mL. Essa solução foi submetida por 1 h a agitação em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente, 300 rpm. Após este período, foram adicionados 3,69 mL de TMOS e 0,075 mL de Etanolamina. A solução foi mantida temperatura ambiente, por um período de 24 h para completar a secagem do suporte.

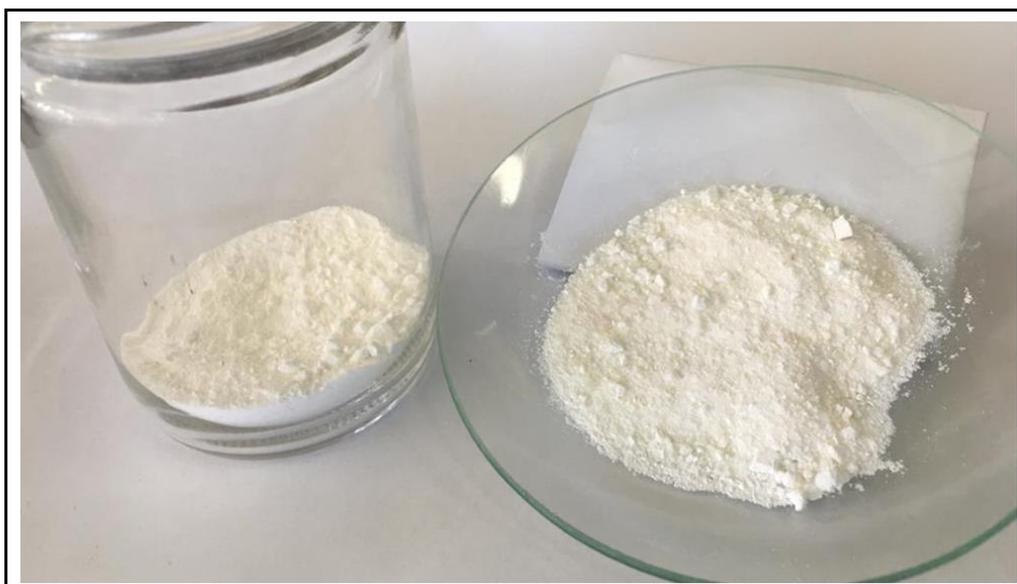
Os biocatalisadores imobilizados obtidos (Figura 2) foram avaliados pelo rendimento de imobilização e medida de atividade de esterificação, descritos nos itens 3.4 e 3.5, respectivamente.

### 3.1.1.3 Avaliação da formação do suporte a partir de diferentes concentrações de água

A lipase de *Candida antarctica* B foi imobilizada *in situ* em uma matriz hidrofóbica obtida pelo método sol-gel. A metodologia utilizada para a preparação dos suportes foi adaptada da descrita por Macario *et al.* (2009), onde utilizou-se Cetiltrimetilamônio (CTMABr) em 1,46 g/mL, volume de TMOS 3,69 mL TMOS e Etanolamina de 0,075 mL concentração da solução de PEG 1500 em 0,10 g/mL, concentração de enzima em 0,18 g/mL e variou-se o volume de água (10 – 18 mL). A presença e ausência do PEG 1500 na solução total também foi avaliada.

Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa de CTMABr (1,46 g/mL), mais 2 mL da solução de enzima e 1 mL de PEG 1500. Água destilada foi adicionada para alcançar o volume total desejado para o experimento, sendo que estes foram de 12, 15 e 18 mL. Essa solução foi submetida por 1 h a agitação em agitador orbital (shaker), a temperatura ambiente, 300 rpm. Após este período, foram adicionados 3,69 mL de TMOS e 0,075 mL de Etanolamina. A solução foi mantida temperatura ambiente, por um período de 24 h para completar a secagem do suporte.

Os biocatalisadores imobilizados obtidos (Figura 2) foram avaliados pelo rendimento de imobilização e medida de atividade de esterificação, descritos nos itens 3.2.1.5 e 3.2.1.6, respectivamente.



**Figura 5. *Candida Antarctica* B após o processo de imobilização pela técnica sol-gel usando TMOS como precursor da sílica**

### 3.1.1.3 Influência da concentração de PEG e de enzima e volume de água na atividade de esterificação do imobilizado

Com finalidade de avaliar a influência do aditivo PEG 1500, concentração de enzima e volume de água na atividade de esterificação do imobilizado, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^3$  com triplicata do ponto central.

**Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no DCCR  $2^3$  completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em xerogel com presença de PEG**

| Variáveis Independentes*     | Códigos        | Níveis |       |       |       |       |
|------------------------------|----------------|--------|-------|-------|-------|-------|
|                              |                | -1,68  | -1    | 0     | +1    | +1,68 |
| Volume total da solução (mL) | X <sub>1</sub> | 9,96   | 12    | 15    | 18    | 20,04 |
| Massa de Enzima (g)          | X <sub>2</sub> | 0,058  | 0,180 | 0,360 | 0,540 | 0,662 |
| Massa de PEG (g)             | X <sub>3</sub> | 0,066  | 0,100 | 0,150 | 0,200 | 0,234 |

### 3.1.1.4 Influência da porcentagem de aditivo (PVA) e da concentração de enzima na atividade de esterificação do imobilizado

Para o estudo do PVA como aditivo na imobilização de xerogel e também com a finalidade de avaliar os parâmetros massa de aditivo e concentração de enzima realizou-se um DCCR  $2^2$ , com triplicata do ponto central.

**Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no DCCR  $2^2$  completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em xerogel com presença de PVA**

| Variáveis Independentes*    | Códigos        | Níveis |       |       |      |       |
|-----------------------------|----------------|--------|-------|-------|------|-------|
|                             |                | -1,41  | -1    | 0     | +1   | 1,41  |
| Massa de Aditivo - PVA (g)  | X <sub>1</sub> | 0,02   | 0,114 | 0,342 | 0,57 | 0,66  |
| Concentração de enzima (mL) | X <sub>2</sub> | 0,295  | 0,5   | 1     | 1,5  | 1,705 |

## 3.2 IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTE SONOGEL

### 3.2.1.1 Processo de Imobilização

A metodologia utilizada para a preparação dos suportes foi adaptada da descrita por Macario *et al.* (2009). Os suportes foram preparados solubilizando brometo de

cetiltrimetilamônio em água, solução enzimática e em algumas amostras solução do aditivo PEG 1500. Essa solução foi submetida por 1 h sob agitação (300 rpm) em agitador orbital (shaker) a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). Após este período, adicionou-se o precursor da sílica tetrametilortosilicato (TMOS) e a etanolamina. Posteriormente, a solução foi submetida ao tratamento de banho ultrassônico (para formação do sonogel),

### 3.2.1.2 Tempo de contato (Ultrassom)

Este procedimento foi realizado ao final da primeira etapa do processo de imobilização descrita no item 3.2.1.1. Após transcorrido o tempo de contato determinado (0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 min), os imobilizados foram colocados em agitador orbital com temperatura ambiente e rotação (160 rpm) controladas por 24 h até completa secagem. Transcorrido esse período, as amostras foram submetidas ao ensaio para verificar o efeito do tratamento ultrassônico sobre a atividade de esterificação.

### 3.2.1.3 Avaliação da influência da temperatura de secagem e da frequência do banho ultrassônico na atividade de esterificação do imobilizado

Para avaliar a influência da temperatura de secagem (ultrassom) e da frequência do banho ultrassônico sobre atividade de esterificação da lipase imobilizada, realizou-se um DCCR  $2^2$ , com triplicata do ponto central, conforme apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3. Variáveis e níveis utilizados no DCCR  $2^2$  completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em sonogel com presença de PEG**

| Variáveis Independentes*                      | Códigos        | Níveis |    |    |    |       |
|---|----------------|--------|----|----|----|-------|
|   |                | -1,41  | -1 | 0  | +1 | 1,41  |
| Frequência Ultrassônica (Hz)                  | X <sub>1</sub> | 1,8    | 10 | 30 | 50 | 58,2  |
| Temperatura de secagem ( $^{\circ}\text{C}$ ) | X <sub>2</sub> | 13,8   | 20 | 35 | 50 | 56,15 |

### 3.2.1.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As determinações analíticas descritas a seguir foram realizadas tanto para a enzima imobilizada em xerogel quanto em sonogel.

### 3.2.1.5. Determinação do rendimento de imobilização

O rendimento do imobilizado foi calculado considerando a atividade total da enzima livre em solução ofertada ao sistema (a qual considera o volume de extrato enzimático empregado no ensaio de imobilização e atividade da enzima livre (U/mL)) e a atividade total presente no derivado imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido e atividade do derivado imobilizado (U/g)) de acordo com a Equação 1.

$$R (\%): \frac{U_x}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

R (%): Rendimento do imobilizado;

$U_x$ : Atividade de esterificação total do derivado imobilizado;

$U_0$ : Atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização.

### 3.2.1.6. 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 na literatura (FERRAZ *et al.*, 2012) A reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada ou livre (aproximadamente 0,1 g) em 5 mL da mistura padrão. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados a 40 °C, em agitador orbital a 160 rpm, durante 40 min. Aliquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para inativar a reação. A quantidade de ácido oleico consumido foi quantificada por titulação com NaOH 0,05 mol/L até o meio atingir pH 11 (ponto de equivalência do ácido oleico). Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da mistura padrão e 15 mL da solução de acetona-etanol.

Uma unidade de atividade enzimática (U/g) foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, calculada pela Equação 2:

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

Onde:

AE: Atividade de esterificação (U/g);

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

V<sub>b</sub>: Volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL);  
 M: Molaridade da solução de NaOH;  
 V<sub>f</sub>: Volume final de meio reacional (mL);  
 t: Tempo (minutos);  
 m: Massa da solução enzimática ou do suporte utilizado (g);  
 V<sub>c</sub>: Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

### 3.2.1.7. Avaliação da estabilidade operacional

A estabilidade operacional ou reuso do biocatalisador imobilizado foi determinado seguindo método descrito por Ficanha *et al* 2015. Este procedimento foi realizado utilizando o imobilizado obtido pelo ponto ótimo do Planejamento descrito no Item 3.3. Foram realizadas sucessivas reações iguais às descritas no Item 3.5, sendo que ao final de cada uma o meio reacional foi removido, e nova adição de solução padrão realizada. Este processo foi repetido até a atividade residual do imobilizado chegar a 50% ou menos da atividade inicial.

### 3.2.1.8 Estabilidade de Armazenamento

Foram avaliadas duas faixas de temperatura de armazenamento para o xerogel : *i*) temperatura ambiente (entre 10 e 30°C) e *ii*) baixas temperaturas (entre 2 e 5°C). Para a última empregou-se uma geladeira (Electrolux – Super freezer DC9A).

Como resposta acompanhou-se a atividade para a síntese do oleato de etila nas condições descritas no item 3.2.1.6. Os ensaios foram realizadas periodicamente (no início diariamente e depois semanalmente), sendo a estabilidade expressa em termos de atividade residual em relação à atividade inicial do dia da síntese (tempo zero ‘0’).

Os resultados foram expressos em porcentagem da atividade residual (AR), calculada pela Equação 3.

$$AR (\%) : \frac{AE_i}{AE_0} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

AE<sub>i</sub>: atividade de esterificação no tempo “i”,

AE<sub>0</sub> da atividade de esterificação no tempo inicial.

### 3.2.1.9 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da lipase CALB livre e imobilizada foram determinadas pelo método de Arrhenius. A partir dos dados obtidos durante a avaliação da estabilidade térmica determinou-se a cinética de degradação de ambos através da análise da ordem de reação.

A estabilidade à temperatura foi realizada através da incubação das enzimas em temperaturas de 40, 60 e 80°C. Amostras foram retiradas ao longo do tempo de incubação para a realização da atividade de esterificação e determinação da atividade residual (AR). A atividade residual (AR) foi calculada por meio da razão da atividade de esterificação no tempo “i” pela atividade de esterificação inicial.

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 4.

$$A = A_0 \exp. (-k_d \cdot t) \quad (4)$$

A partir das constantes de desativação térmica em cada temperatura, foram obtidos os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) (Equação 5) que corresponde ao tempo necessário para que ocorra a inativação de 50 % da concentração enzimática inicial, na temperatura testada.

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

Onde:

$A_0$ : atividade inicial;

A: atividade final;

t: tempo;

$t_{1/2}$ : tempo de meia vida;

$K_d$ : constante de desativação.

### 3.2.1.10 Análise estatística

Os resultados para atividade de esterificação obtidos no planejamento foram analisados por meio de Análise de Variância e Metodologia de Superfície de Resposta utilizando-se o módulo *Experimental Design* do *Software Statistica 5.0*.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

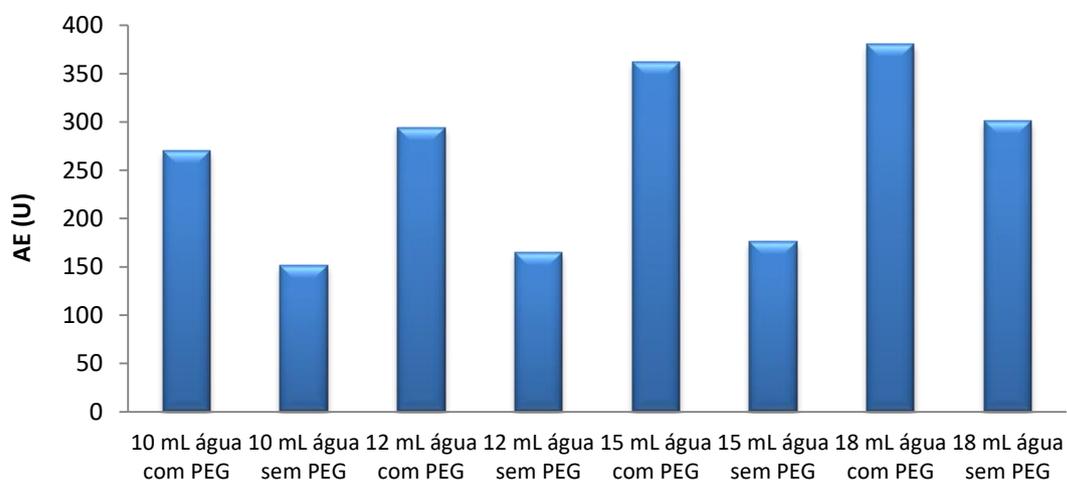
Os resultados seguidos das discussões dos imobilizados em xerogel usando como aditivo o PEG e PVA serão apresentados a seguir. COLOCAR O SONOGEL... CARACTERIZAÇÃO.

### 4.1 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM XEROGEL UTILIZANDO PEG COMO ADITIVO

#### 4.1.1 Avaliação da formação do suporte a partir de diferentes volumes de solução

Testes de volume total de água utilizada e presença/ausência de PEG 1500 na formação do suporte com TMOS foram realizados, a fim de obter um xerogel com características visuais ideais, além de maior atividade de esterificação possível. Neste estudo, variou-se a volume de água considerando um volume absoluto de 10,12, 15 e 18 mL, o qual considera os 2 mL de extrato enzimático e 1 mL da solução do aditivo PEG 1500.

Após a secagem do xerogel, foram realizados testes para determinação da atividade de esterificação dos biocatalisadores e o cálculo do rendimento. A atividade de esterificação obtida para cada experimento está apresentada na Figura 6



**Figura 6. Atividade de esterificação (AE) dos biocatalisadores imobilizados em xerogel com diferentes volumes de água, com e sem o uso do PEG 1500**

De acordo com a Figura 6 observa-se que a atividade de esterificação para os suportes obtidos variaram de 150 a 380 U/g, sendo que o melhor resultado foi obtido no experimento com maior volume de água (18 mL) na presença de PEG 1500, demonstrando a importância, tanto da água quanto aditivo no processo de imobilização.

Este efeito positivo da água na região estudada foi vinculado a dois fatores: i) a uma melhor dispersão da enzima no meio reacional, possibilitando assim uma melhor distribuição da mesma na estrutura do suporte, evitando assim a formação de aglomerados (Clusters) enzimáticos, ampliando assim as possibilidades de interações do substrato com os sítios ativos da enzima e, ii) a camada de hidratação da lipase. Ambos fatores contribuem para a melhora na atividade dos imobilizados.

Biomoléculas como as enzimas são *anfipáticas*, possuindo regiões superficiais polares (ou carregadas) e não-polares. Em um ambiente aquoso, essas duas regiões da molécula experimentam tendências conflitantes; a região hidrofílica interage favoravelmente com a água enquanto a região hidrofóbica tem a tendência de evitar o contato com a água. Assim, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das enzimas agregam-se para apresentar a menor área hidrofóbica possível à água (ficam confinados no interior da molécula protéica) e as regiões polares, normalmente responsáveis pelos sítios ativos, são arranjadas para maximizar as interações com o solvente aquoso (LIMA e AGNES, 1999), melhorando a atividade enzimática.

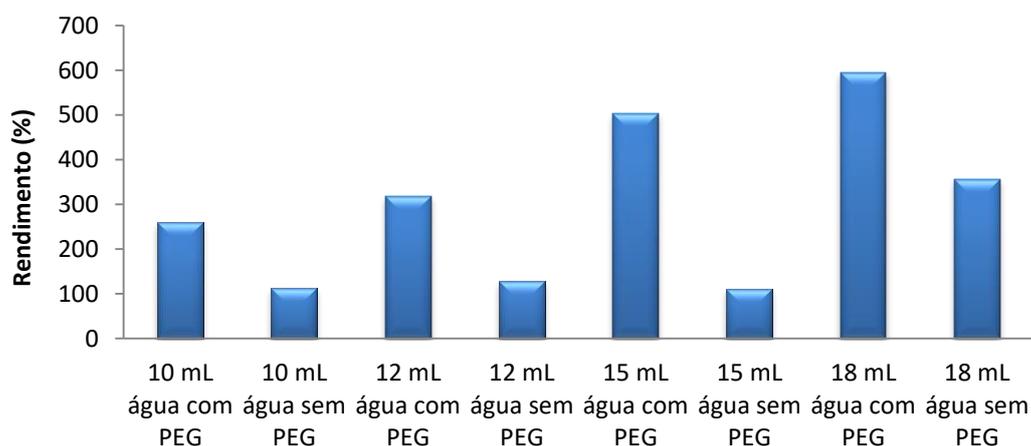
Quando água é adicionada a um sistema enzimático não-aquoso, ela é distribuída entre solvente, enzima, substrato e suporte (se presente). A quantidade de água ligada as moléculas de enzima é fundamental para a atividade catalítica em meio não aquoso. A explicação mais provável para isso advém do fato da água aumentar a mobilidade e a flexibilidade dos sítios ativos e, concomitantemente, a polarização da estrutura protéica (LIMA e AGNES, 1999).

Numerosas discussões e trabalhos (KAZANDJIA *et al* 1986; ROSS E SCHNEIDER 1991), têm sido dedicados para determinar a quantidade adequada de água para a atividade enzimática em meio orgânico. Zaks e Klibanov 1991, examinaram três modelos de enzimas *polifenoloxidase*, *álcool desidrogenase* e *álcool oxidase* em solventes de hidrofobicidades e conteúdo de água diferentes. Eles mostraram que a atividade enzimática estava relacionada à quantidade de água ligada à proteína e não à concentração de água nos solventes orgânicos. A água ligada àquelas enzimas em solventes orgânicos não formaria uma camada de água verdadeira mas, de preferência, uns poucos "clusters", provavelmente, em torno de regiões carregadas e polares da superfície enzimática. Os resultados desse estudo foram reinterpretados em termos de atividade de água por Halling (HALLING, 1990), confirmando que a atividade enzimática ótima está relacionada com a atividade de água, ou seja, com a camada de hidratação da enzima, independente do solvente usado. Este mesmo autor tem proposto que a atividade

termodinâmica da água é um parâmetro que deve ser usado para quantificar o nível de água associado com a enzima. A água, dessa maneira, é requerida, unicamente, para a função catalítica das enzimas em solventes orgânicos, contribuindo para a formação de todas as ligações não covalentes e pontes de hidrogênio da estrutura protéica.

Também verifica-se que todos os suportes na presença de PEG apresentaram maior atividade que os experimentos com mesmo volume de água e ausência de PEG. Casos semelhantes foram relatados na literatura (KEELING-TUCKER *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2002), que demonstram que o PEG tem um efeito estabilizante sobre a enzima frente ao suporte e a atividade catalítica é aumentada por consequência.

Os resultados de rendimento da imobilização estão apresentados na Figura 7, onde observa-se que o experimento com maior volume de água e presença de PEG apresentou o maior rendimento, e todos os experimentos na presença de PEG tiveram rendimentos maiores que seus respectivos na ausência deste.



**Figura 7. Rendimento de imobilização (RI) dos biocatalisadores imobilizados em xerogel com diferentes volumes de água, com e sem o uso do PEG 1500**

Cabe salientar que vários experimentos apresentaram rendimento acima de 100%, ou seja, o biocatalisador teve sua atividade de esterificação aumentada quando imobilizado no xerogel em relação à sua forma livre, chegando, no melhor caso, a cerca de 600 %. Este fenômeno pode estar relacionado a alguma modificação na estrutura da enzima durante a formação do suporte, ocasionando desobstrução de sítios ativos possivelmente inacessíveis ao substrato anteriormente à imobilização.

Em relação ao PEG, trabalhos relatam a utilização de macromoléculas como esta no processo de imobilização para induzir uma melhor distribuição da lipase na superfície do suporte, o que permite um melhor contato da enzima imobilizada com o meio reacional, favorecendo as condições reacionais e, como consequência, o aumento da

atividade e do rendimento (ROCHA *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2006; MOHIDEM *et al.*, 2012; FICANHA *et al.* 2015).

#### 4.1.2 Influência da concentração de PEG e de enzima e volume de água na atividade de esterificação do imobilizado

Para a otimização do processo de imobilização considerando as variáveis, concentração de PEG, de enzima e volume total de água, foi construído um DCCR 2<sup>3</sup> a fim de se obter a máxima atividade de esterificação. Os resultados obtidos para cada experimento realizado encontram-se na Tabela 1, onde pode-se, observar, que os experimentos do ponto central do planejamento 15, 16 e 17 ( $X_1 = 15$  mL;  $X_2 = 0,36$ g;  $X_3 = 0,15$ g) apresentaram a maior atividade de esterificação, chegando a 394,92 U/g, enquanto o experimento com menor volume de água e menores concentrações de PEG e enzima (Experimento 1), com 133,37 U/g, apresentou a menor atividade.

**Tabela 4. Matriz do DCCR 2<sup>3</sup> em função das variáveis temperatura de Volume total da solução, Massa de enzima e Massa de PEG 1500 na atividade de esterificação do mobilização em xerogel com adição de PEG**

| Experimento | X <sub>1</sub> (mL) | X <sub>2</sub> (g) | X <sub>3</sub> (g) | Média AE ± DPad |
|-------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| 1           | -1 (12,00)          | -1 (0,180)         | -1 (0,100)         | 133,37 ± 33,97  |
| 2           | +1 (18,00)          | -1 (0,180)         | -1 (0,100)         | 176,45 ± 28,43  |
| 3           | -1 (12,00)          | +1 (0,540)         | -1 (0,100)         | 184,30 ± 42,56  |
| 4           | +1 (18,00)          | +1 (0,540)         | -1 (0,100)         | 230,35 ± 21,00  |
| 5           | -1 (12,00)          | -1 (0,180)         | +1 (0,200)         | 173,34 ± 12,38  |
| 6           | +1 (18,00)          | -1 (0,180)         | +1 (0,200)         | 182,22 ± 36,70  |
| 7           | -1 (12,00)          | +1 (0,540)         | +1 (0,200)         | 210,58 ± 42,12  |
| 8           | +1 (18,00)          | +1 (0,540)         | +1 (0,200)         | 262,22 ± 14,65  |
| 9           | -1,68 (9,96)        | 0 (0,360)          | 0 (0,150)          | 139,13 ± 11,59  |
| 10          | +1,68 (20,04)       | 0 (0,360)          | 0 (0,150)          | 152,94 ± 11,76  |
| 11          | 0 (15,00)           | -1,68 (0,058)      | 0 (0,150)          | 199,03 ± 33,47  |
| 12          | 0 (15,00)           | +1,68 (0,662)      | 0 (0,150)          | 255,31 ± 29,01  |
| 13          | 0 (15,00)           | 0 (0,360)          | -1,68 (0,066)      | 145,18 ± 17,51  |
| 14          | 0 (15,00)           | 0 (0,360)          | +1,68 (0,234)      | 174,74 ± 6,58   |
| 15          | 0 (15,00)           | 0 (0,360)          | 0 (0,150)          | 393,26 ± 19,46  |
| 16          | 0 (15,00)           | 0 (0,360)          | 0 (0,150)          | 394,92 ± 17,92  |
| 17          | 0 (15,00)           | 0 (0,360)          | 0 (0,150)          | 394,20 ± 11,59  |

X<sub>1</sub>: Volume total da solução; X<sub>2</sub>: Massa de enzima; X<sub>3</sub>: Massa de PEG 1500

Analisando de forma independente as variáveis podemos perceber um efeito positivo de cada uma delas, com os ensaios conduzidos com os níveis superiores (+1) apresentando maiores atividades em relação aos conduzidos com os níveis inferiores (-1). Para ilustrar, podemos citar o aumento de atividade de 50% observado entre os ensaios 1 (empregando os níveis inferiores) e 8 (empregando os níveis superiores).

Também podemos perceber que quando aumentamos o volume total da solução e a massa de enzimas as atividades de esterificação seguem uma tendência crescente para este aumento (ensaios 4 e 8). mesmo comportamento pode ser observado para o aditivo PEG, onde ao aumentarmos a massa a atividade de esterificação aumenta proporcionalmente (ensaios 3 e 7).

No entanto as maiores atividades foram verificadas no ponto central o qual foi sintetizado nas condições intermediárias sugerindo a otimização do processo de imobilização de xerogel com PEG.

Por este fato, podemos observar que as máximas atividades de esterificação se deram nas condições intermediárias do planejamento DCCR, corroborando com os dados expressos na literatura, para a influência da água e adição de PEG.

De acordo com Talbert e Goddard *et al* (2012) o material utilizado como suporte para a imobilização de enzimas pode modificar a quantidade de água total nas proximidades da enzima e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura reacional. Portanto, o balanço hidrofílico/hidrofóbico da superfície do suporte é fundamental, pois na etapa de preparação de suportes hidrofóbicos a água pode ficar retida nos interstícios porosos e, conseqüentemente, ao redor da enzima imobilizada. A presença da quantidade mínima de moléculas de água no microambiente é necessária para preservação da estrutura conformacional da enzima. Todavia, o uso de suportes hidrofílicos no processo de imobilização promove a competição da água entre o suporte e a enzima durante a reação, influenciando no equilíbrio termodinâmico do sistema (CANTONE *et al* 2010).

A natureza física do suporte, por exemplo, morfologia, tamanho e distribuição dos poros, influencia também diretamente no rendimento de imobilização e em efeitos difusionais causados pela transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores imobilizados. Essas limitações podem ser resumidas em duas fases: transferência de massa externa, que envolve a transferência de reagentes/substratos do meio reacional até a superfície do suporte de imobilização, e a transferência de massa interna, que descreve a transferência de reagentes/substratos no suporte de imobilização até o sítio ativo da enzima. Qualquer etapa da difusão pode limitar a atividade global da

enzima imobilizada (ISPAS *et al* 2009; LIESE e HILTTERHAUS, 2013; ORREGO *et al* 2010).

Por este fato, podemos observar que as máximas atividades de esterificação se deram em volume total de solução em valores intermediários (15 mL), corroborando com os dados expressos na literatura.

A Tabela 5 apresenta o coeficiente de regressão e erro padrão, e valores de t e p para a atividade de esterificação a um nível de confiança de 95 %:

**Tabela 5. Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de t e p do DCCR 2<sup>3</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica para a atividade de esterificação.**

| Fonte de Variação              | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t       | p     |
|--------------------------------|--------------------------|-------------|---------|-------|
| Média                          | 392,13                   | 0,48        | 818,13  | 0,000 |
| X <sub>1</sub> (L)             | 12,67                    | 0,23        | 56,25   | 0,000 |
| X <sub>1</sub> (Q)             | -81,21                   | 0,25        | -327,30 | 0,000 |
| X <sub>2</sub> (L)             | 23,20                    | 0,23        | 103,03  | 0,000 |
| X <sub>2</sub> (Q)             | -52,46                   | 0,25        | -211,44 | 0,000 |
| X <sub>3</sub> (L)             | 11,25                    | 0,23        | 49,97   | 0,000 |
| X <sub>3</sub> (Q)             | -76,27                   | 0,25        | -307,42 | 0,000 |
| X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub> | 5,72                     | 0,29        | 19,44   | 0,003 |
| X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub> | -3,58                    | 0,29        | -12,16  | 0,007 |
| X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub> | 1,55                     | 0,29        | 5,27    | 0,034 |

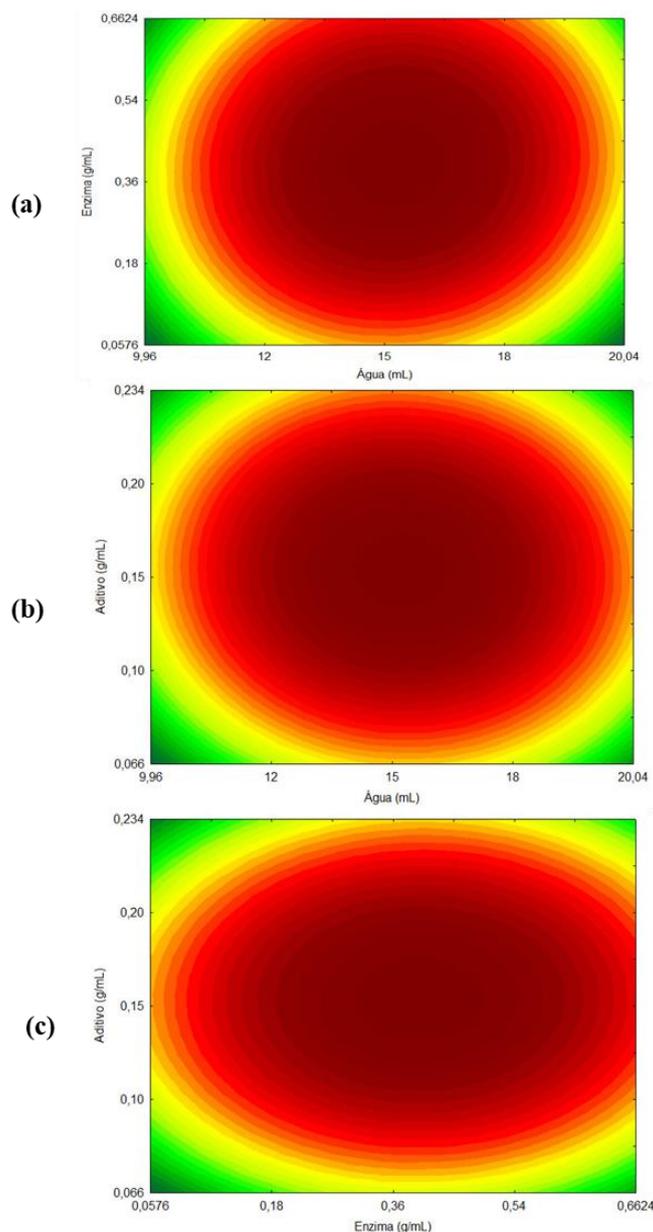
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, observa-se que as três variáveis têm efeito positivo sobre esta, o que indica que aumento no volume de água e na concentração de enzima e PEG afetarão positivamente a atividade.

A Tabela 6 apresenta a análise de variância e demonstra que se obteve um coeficiente de regressão de 0,96 e F calculado maior que F tabelado, permitindo, dessa forma, a construção do modelo matemático (Equação 6) que representa o sistema e também as curvas de contorno Figura 8.

**Tabela 6. Análise de variância dos resultados obtidos no DCCR 2<sup>3</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis volume de água (X1), concentração de enzima (X2) e PEG (X3).**

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor F <sub>calc</sub> | p-valor  |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------------------|----------|
| Regressão         | 123143,45          | 9                  | 13682,61       | 22,67                   | 0,000001 |
| Resíduo           | 4224,29            | 7                  | 603,47         |                         |          |
| Total             | 127367,74          | 16                 |                |                         |          |

$$AE = 392,13 + 12,67x_1 - 81,21x_1^2 + 23,20x_2 - 52,46x_2^2 + 11,25x_3 - 76,27x_3^2 + 5,72x_1x_2 - 3,58x_1x_3 + 1,55x_2x_3 \quad \text{Eq. (6)}$$



**Figura 8. Curva de contorno para a atividade de esterificação em função das variáveis água e enzima (a), aditivo e água (b) e enzima e aditivo PEG (c), respectivamente.**

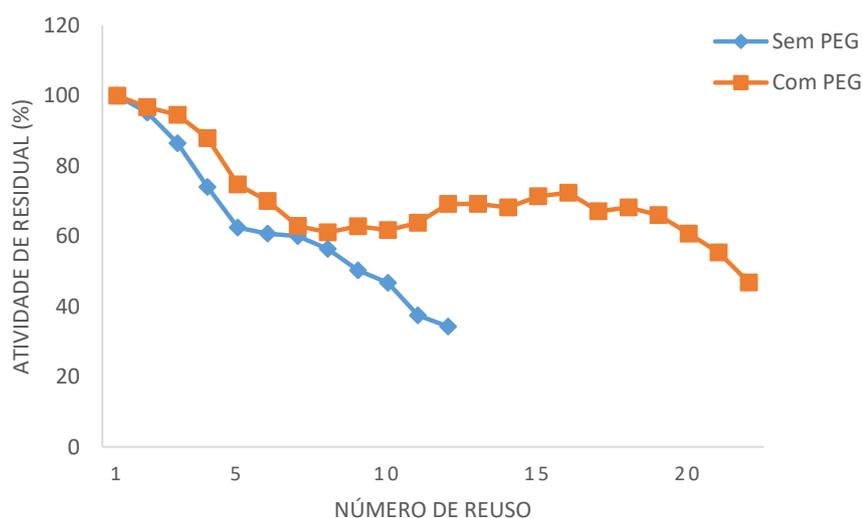
Na Figura 8 pode-se observar que esta tende a valores ótimos em valores próximos ao ponto central do planejamento ( $\pm 309$  U/g).

A concentração ótima de água ( $X_1$ ), enzima ( $X_2$ ) e aditivo PEG ( $X_3$ ) para máxima atividade de esterificação foi calculada por meio da solução de um sistema quadra de ordem 3x3. Este sistema foi obtido pelas derivadas parciais do modelo em relação as três variáveis e igualadas a zero. As atividades de esterificação máximas da lipase imobilizada foram obtidas nos níveis codificados 0,084, 0,227 e 0,07 para água, enzima e PEG, respectivamente. Esses níveis codificados correspondem aos valores 15,25 (mL) de água, 0,4 (g) de enzima e 0,15 (g) de aditivo.

Nova imobilização enzimática foi realizada utilizando os valores obtidos como ótimos no planejamento e a atividade de esterificação deste derivado imobilizado encontrada experimentalmente (393,2 U/g) correspondeu ao valor teórico do modelo, validando-o, tendo um rendimento de imobilização de 482 %.

#### 4.1.3 Estabilidade operacional

O estudo da estabilidade operacional (reuso) foi realizado com o suporte obtido nas condições ótimas do planejamento experimental (15,25 (mL) de água, 0,4 (g) de enzima e 0,15 (g) de aditivo). A Figura 9 apresenta a atividade residual e o número de reusos realizados com o suporte xerogel com e sem PEG 1500.



**Figura 9. Reuso da enzima imobilizada em xerogel, com e sem PEG 1500.**

Pode-se observar na Figura 9 que o número de ciclos obtidos, considerando 50% da atividade inicial, chegou a 21 para o imobilizado com a presença do aditivo PEG. Já para o derivado imobilizado sem a presença do aditivo o número de ciclos com a atividade residual proposta foi de 9. Estes resultados demonstram que o suporte tem uma boa resistência às possíveis agressões do meio reacional e preserva a atividade enzimática com qualidade durante os ciclos reacionais.

A perda de conversão (atividade) e/ou eficiência catalítica do imobilizado entre os ciclos é uma tendência esperada em processos catalíticos e pode estar vinculada a diferentes fatores, tais como: i) inativação da enzima por desnaturação, ii) lixiviação do suporte e iii) obstrução física do sítio ativo da enzima, os quais podem se manifestar independentemente ou associativamente (CARVALHO *et al.* , 2015).

O fato das enzimas na forma livre serem solúveis no meio reacional implica em custo, já que estas têm valor agregado alto. Dessa forma, a reutilização destes biocatalisadores em mais de um ciclo de reação figura entre os principais objetivos da imobilização (FICANHA, 2015).

#### **4.1.4 Estabilidade de armazenamento**

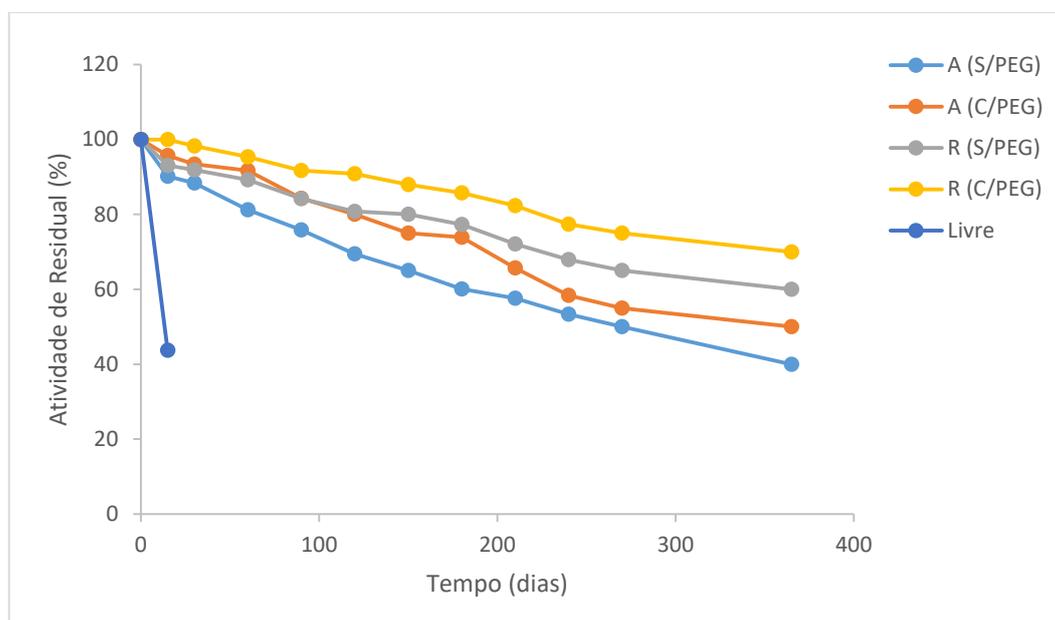
A estabilidade do armazenamento é um dos critérios mais importantes para a aplicação da enzima em escala industrial. Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com enzima livre, desde que se consiga um tempo de meia vida suficientemente longo para a enzima imobilizada,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

A atividade catalítica das enzimas imobilizadas pode ser afetada pela afinidade do suporte pela água. A natureza hidrofílica-hidrofóbica do suporte é relevante para a catalise, pois é preciso que esse apresente certa afinidade com o meio reacional e promova a transferência de massa, mas também que suas características hidrofóbicas minimizem a interação deste com o microambiente e mantenham o equilíbrio aquoso da estrutura do biocatalisador (SOARES, 2012).

O uso de suportes como o poliuretano, pode promover a hiperativação da atividade catalítica e incremento da estabilidade enzimática, devido a que, por suas características hidrofóbicas, menos água será retida e todos os processos de desativação relacionados

com o percentual de hidratação serão minimizados, melhorando a preservação da estrutura da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al*2010)

A Figura 10 corresponde ao comportamento da atividade de esterificação residual para os derivados imobilizados com e sem a adição de aditivo (PEG 1500), armazenados a temperatura ambiente (5 – 30 °C) e em refrigerador (-2 – 4 °C),. Após 365 dias de armazenamento, o único imobilizado que não apresentou atividade residual acima ou em torno de 50% foi o imobilizado armazenado em temperatura ambiente e sem a dição de PEG. Cabe destacar que a enzima livre apresentou atividade residual acima de 50% somente por 20 dias de armazenamento.



A: temperatura ambiente; R: temperatura de refrigerador

**Figura 10. Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada em xerogel, com e sem PEG 1500, em temperatura ambiente e refrigerador.**

Dentre os sistemas avaliados, os derivados imobilizados armazenados em refrigeração apresentaram um comportamento melhor que os armazenados a temperatura ambiente. Também observamos que, independente da temperatura de armazenamento, os derivados imobilizados com PEG apresentaram melhor desempenho que os derivados imobilizados produzidos sem PEG.

Esse estudo da estabilidade de estocagem é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial é mantida ao longo do tempo de armazenamento.

Nesse aspecto, meios com baixa hidratação são recomendáveis, pois evitam a solvatação dos sítios ativos das enzimas pelo excesso de água e melhoram os processos de difusão do substrato até os sítios ativos. No caso da lipase imobilizada, essas características permitem que a hidratação necessária para a reação de hidrólise catalisada pelo derivado enzimático ocorra em conjunto com o fornecimento do substrato (meio aquoso), sem que haja a necessidade de romper a camada de solvatação das moléculas de pectinases, como provavelmente acontece quando essas se encontram na forma livre dissolvidas em meios líquidos.

Bahrami e Hejazi (2013) estudaram a estabilidade ao armazenamento a 4° C da pectinase imobilizada em nanopartículas de AOT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e observaram que depois de 30 dias o derivado imobilizado manteve 60 % da atividade inicial, resultados mais promissores em comparação aos reportados por estes autores foram encontrados neste estudo.

#### 4.1.5 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 xerogel com e sem a presença de PEG utilizado como aditivo (Tabela 4).

**Tabela 7. Constante de desativação térmica ( $K_d$ ), os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da lipase CALB livre e imobilizada em xerogel com e sem PEG 1500**

| Temperatura (°C) | Enzima Livre       |       |               | Xerogel (sem PEG)  |       |               | Xerogel (com PEG)  |       |               |
|------------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|-------|---------------|
|                  | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) |
| 40               | 0,12               | 0,89  | 5,79          | 0,0819             | 0,91  | 8,46          | 0,0575             | 0,81  | 12,07         |
| 60               | 0,42               | 0,89  | 1,66          | 0,2180             | 0,90  | 3,18          | 0,1965             | 0,91  | 3,53          |
| 80               | 1,48               | 0,99  | 0,47          | 0,6307             | 0,93  | 1,10          | 0,5631             | 0,91  | 1,23          |

A imobilização da lipase em xerogel com e sem a presença PEG 1500 como aditivo apresentaram valores de  $K_d$  menores e tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) maiores aos obtidos para a enzima livre.

De um modo geral, constatou-se que o aumento da temperatura afeta negativamente a o processo de desativação térmica dos derivados enzimáticos estudados. Porém, foi observado que a velocidade com que acontece a inativação (representada pela constante  $K_d$ ) do derivado imobilizado é muito menor se comparada com a livre livre. O baixo valor de  $K_d$ , o qual é proporcional à concentração de enzima ativa presente, da lipase imobilizada sugere que o processo de imobilização da lipase em xerogel tanto na presença do aditivo com sem a adição do mesmo protegeu à enzima da inativação térmica na faixa de temperatura de 40°C.

A lipase imobilizada em xerogel mostrou-se mais estável à desativação térmica que as formas livres, obtendo-se tempos de  $t_{1/2}$  de 8,46 e 12,07 h sem adição de PEG, com adição de PEG respectivamente, para a temperatura de 40°C. Valores altos desses parâmetros são desejáveis durante as operações industriais, pois garantem que a enzima é mais resistente à desativação ocasionada pelo efeito da temperatura (DE CASTRO *et al*2015)

Esse comportamento indica que a estabilidade térmica da enzima imobilizada é maior do que a da enzima livre, sugerindo que o suporte em estudo atua protegendo a enzima dos efeitos negativos da temperatura em relação a sua conformação ativa. Este mesmo comportamento foi observado por ZIBIOLLO *et al.*, 2014 e YANG *et al.*, 2010.

Ficanha 2017 ao analisar xerogel e aerogel com o uso de PEG como aditivo no estudo da constate de desativação e do tempo de meia vida observou um comportamento similar os resultados obtidos neste estudo.

## 4.2 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM XEROGEL UTILIZANDO PVA COMO ADITIVO

### 4.2.1 Influência da porcentagem de aditivo e da concentração de enzima na atividade de esterificação do imobilizado

A síntese do derivado imobilizado em xerogel com PVA também foi conduzida empregando um DCCR 2<sup>2</sup> para avaliar os efeitos das variáveis sobre o processo de imobilização. As variáveis, porcentagem de aditivo e concentração de enzima, foram estudadas a fim de se obter a máxima atividade de esterificação. Os níveis com seus respectivos valores e os resultados de atividade para cada experimento realizado encontram-se apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8. DCCR 2<sup>2</sup> em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima na atividade de esterificação do imobilizado em xerogel**

| Experimento | X <sub>1</sub> (g) | X <sub>2</sub> (mL) | Atividade<br>AE ± DPad |
|-------------|--------------------|---------------------|------------------------|
| 1           | -1 (0,114)         | -1 (0,5)            | 167,86 ± 30,99         |
| 2           | +1 (0,57)          | -1 (0,5)            | 295,99 ± 30,81         |
| 3           | -1 (0,114)         | +1 (1,5)            | 314,10 ± 13,60         |
| 4           | +1 (0,57)          | +1 (1,5)            | 585,55 ± 11,63         |
| 5           | -1,41 (0,02)       | 0 (1)               | 457,87 ± 32,50         |
| 6           | +1,41 (0,66)       | 0 (1)               | 536,44 ± 30,22         |
| 7           | 0 (0,342)          | -1,41 (0,295)       | 188,82 ± 31,22         |
| 8           | 0 (0,342)          | +1,41 (1,705)       | 646,98 ± 33,55         |
| 9           | 0 (0,342)          | 0 (1)               | 699,54 ± 18,65         |
| 10          | 0 (0,342)          | 0 (1)               | 694,36 ± 18,08         |
| 11          | 0 (0,342)          | 0 (1)               | 695,36 ± 11,59         |

X<sub>1</sub>: Massa de aditivo; X<sub>2</sub>: volume de extrato enzimático

Como para os derivados imobilizados com PEG, os derivados imobilizados com PVA apresentaram, quando analisados de forma independente, um efeito positivo para as variáveis estudadas, com os ensaios conduzidos com os níveis superiores (+1) apresentando maiores atividades em relação aos conduzidos com os níveis inferiores (-1). Para ilustrar, podemos citar o aumento de atividade de aproximadamente 200 %

observado entre os ensaios 1 (167 U/g), empregando os níveis inferiores (-1) e 6 (536 U/g), empregando os níveis superiores (+1).

Também podemos perceber que quando aumentamos a massa de aditivo, mantendo constante o volume de extrato enzimático (ensaios 1 e 2, 3 e 4) as atividades de esterificação seguem uma tendência crescente para este aumento. O mesmo comportamento pode ser observado para o volume de extrato enzimático (ensaios 1 e 3, 2 e 4), cujo aumento proporcionada um aumento de atividade de esterificação.

No entanto as maiores atividades  $\cong 695$  U/g, foram verificadas no ponto central o qual foi sintetizado nas condições intermediárias sugerindo a otimização do processo de imobilização de xerogel com PVA.

Em termos de atividade, o derivado imobilizado com PVA, com  $\cong 695$  U/g, apresentou uma atividade 1,76 vezes superior a observada para o derivado imobilizado com PEG, com  $\cong 394$  U/g.

Esta diferença de atividade foi vinculada as propriedades físico-químicas dos derivados, como área superficial e porosidade, as quais variam conforme o aditivo utilizado e podem estar contribuindo para a retenção da enzima no suporte silicioso sintetizado e, conseqüentemente na atividade do mesmo.

Corroborar com esta hipótese estudo realizado por Soares *et al* 2006 e Souza 2012, os quais observaram que o uso do aditivo PEG proporcionou uma menor área superficial e maior volume e diâmetro dos poros da sílica obtida pela técnica sol-gel quando comparado com a sílica obtida utilizando PVA. Esta diminuição no tamanho médio do poro da sílica na presença PVA, possivelmente devido à contração do gel na etapa de policondensação completa, esteja contribuindo para o aprisionamento/retenção da enzima na estrutura do material silicioso e, conseqüentemente na atividade do mesmo.

Portanto, o tipo de aditivo empregado deve ser considerado visto que o mesmo está associado às mudanças nas características morfológicas do suporte e possivelmente do sistema imobilizado.

Os dados experimentais obtidos do DCCR foram analisados por análise de variância. A Tabela 9 apresenta o coeficiente de regressão e erro padrão, e valores de t e p para a atividade de esterificação a um nível de confiança de 95 %.

**Tabela 9. Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de t e p do DCCR 2<sup>2</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima para a atividade de esterificação.**

| Fonte de Variação | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t       | p     |
|-------------------|--------------------------|-------------|---------|-------|
| Média             | 696,88                   | 1,58        | 440,07  | 0,000 |
| X1 (L)            | 63,86                    | 0,97        | 65,75   | 0,000 |
| X1 (Q)            | -129,50                  | 1,16        | -111,74 | 0,000 |
| X2 (L)            | 135,75                   | 0,97        | 139,78  | 0,000 |
| X2 (Q)            | -169,36                  | 1,16        | -146,14 | 0,000 |
| X1.X2             | 36,08                    | 1,37        | 26,31   | 0,001 |

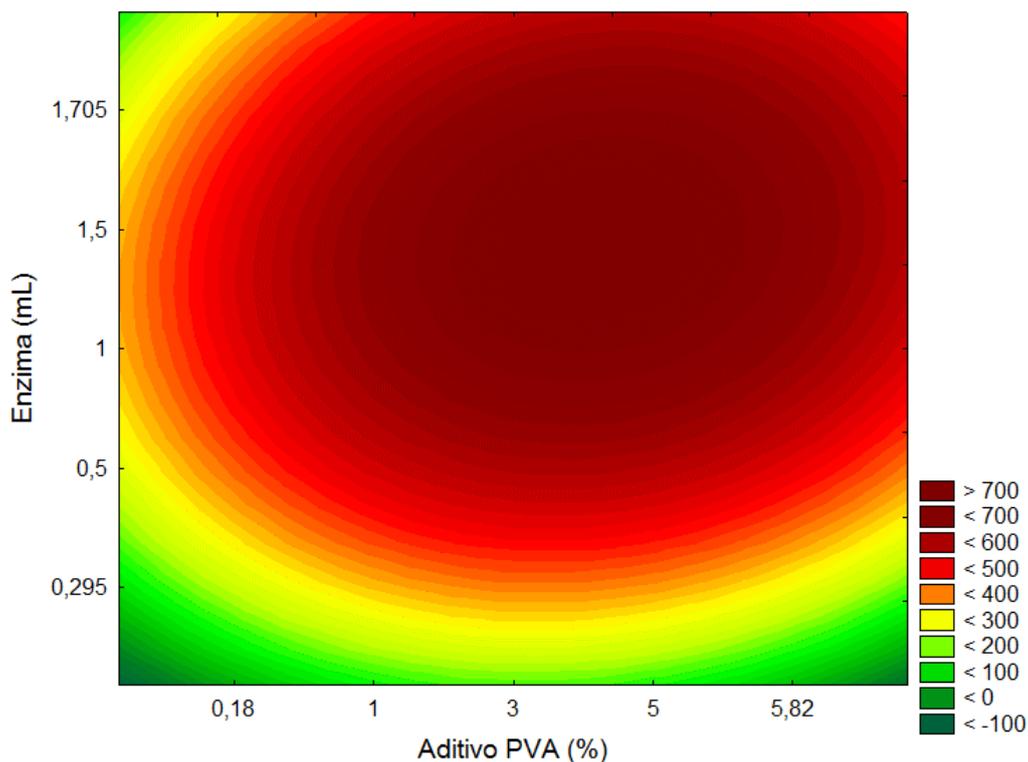
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, todos os fatores avaliados foram estatisticamente validados ( $p \leq 0,05$ ) no que se refere à atividade de esterificação dos imobilizados. Observa-se que as duas variáveis têm efeito positivo sobre esta, o que indica que aumento na massa de aditivo e no volume de extrato enzimático afetarão positivamente a atividade.

A Tabela 10 apresenta a análise de variância e demonstra que se obteve um coeficiente de regressão de 0,95 e F calculado maior que F tabelado, permitindo, dessa forma, a construção do modelo matemático (Equação 8) curvas de contorno (Figura 11) para variáveis porcentagem de aditivo e concentração de enzima.

**Tabela 10. Análise de variância dos resultados obtidos no DCCR 2<sup>2</sup> da imobilização em xerogel em função das variáveis porcentagem de aditivo (PVA) e concentração de enzima**

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor F <sub>calc</sub> | p-valor |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------------------|---------|
| Regressão         | 384733,13          | 5,00               | 76946,63       | 9,06                    | 0,0001  |
| Resíduo           | 42456,28           | 5,00               | 8491,26        |                         |         |
| Total             | 427189,42          | 10,00              |                |                         |         |

$$AE = 476,59 + 129,92x_1 - 92,04x_1^2 + 30,68x_2 - 127,01x_2^2 - 25,00x_1x_2$$



**Figura 11. Curva de contorno para a atividade de esterificação em função das variáveis massa de aditivo (PVA) e volume de extrato enzimático.**

A Figura 11 acima representam a atividade de esterificação em função das variáveis estudadas no planejamento experimental, e pode-se observar que esta tende a valores ótimos em valores próximos ao ponto central do planejamento.

A massa de aditivo ( $X_1$ ) e o volume de extrato enzimático ( $X_2$ ) para máxima atividade de esterificação foi calculada por meio da solução de um sistema linear de ordem  $2 \times 2$ . Este sistema foi obtido pelas derivadas parciais do modelo em relação as duas variáveis e igualadas a zero.

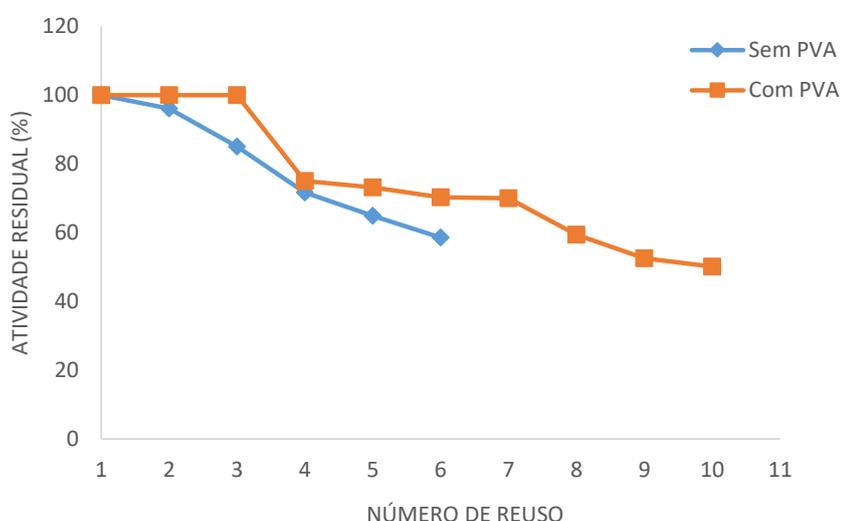
As atividades de esterificação máximas da lipase imobilizada foram obtidas nos níveis codificados 0,3069 e 0,4335 para massa de aditivo ( $X_1$ ) e o volume de extrato enzimático ( $X_2$ ), respectivamente. Esses níveis codificados correspondem aos valores 0,411 g de aditivo PVA e 1,22 mL de extrato enzimático.

Nova imobilização enzimática foi realizada utilizando os valores obtidos como ótimos no planejamento e a atividade de esterificação deste derivado imobilizado encontrada experimentalmente (690,1 U/g) foi similar ao valor teórico do modelo validando-o, correspondendo a um rendimento de imobilização de 601,34%.

#### 4.2.2. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional do xerogel imobilizado com PVA 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 abaixo.

A Figura 12 apresenta a atividade residual e o número de ciclos realizados com o suporte xerogel na presença e ausência do aditivo PVA, nas condições ótimas do planejamento experimental (0,411g de massa do aditivo e 1,22 mL de concentração de enzima).



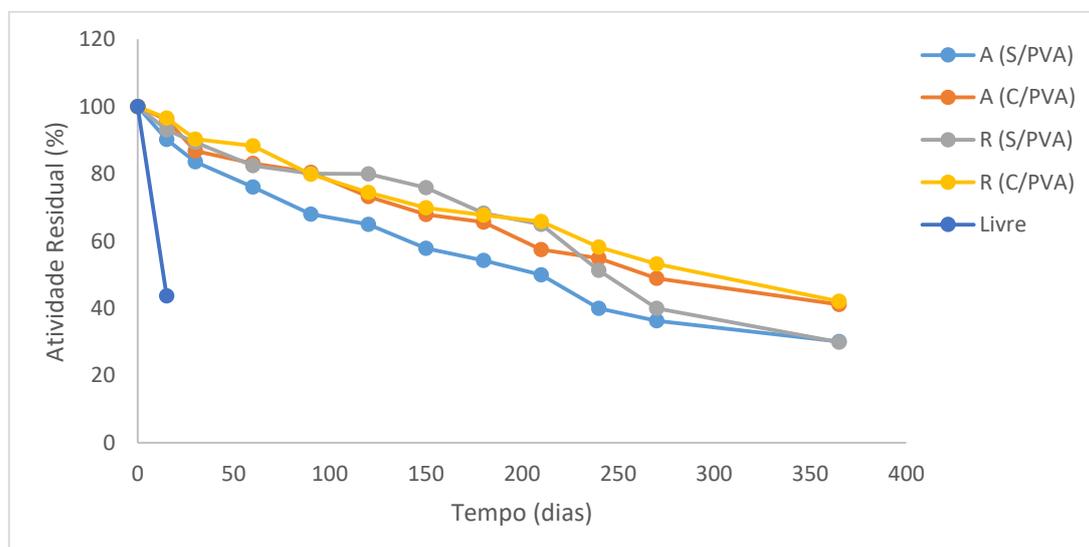
**Figura 12. Reuso da enzima imobilizada em xerogel, com e sem adição de PVA.**

Observa-se na figura 12 que o número de ciclos obtidos, considerando 50% da atividade inicial, chegou a 10 para o imobilizado com a presença do aditivo PVA. Já para o imobilizado sem a presença do aditivo o número de ciclos com atividade residual proposta foi de 6. Resultados este, quando comparados ao xerogel com PEG, inferiores ao estudo anterior.

O uso de suportes macroporosos para imobilização de enzimas é pouco relatado na literatura e relacionado com a possibilidade de lixiviação da enzima do poro do suporte durante a utilização do biocatalisador imobilizado. Portanto, sugere-se o uso de suportes micro ou mesoporosos (ISPAS *et al* 2009; GERARDIN *et al* 2013). A diferença observada entre os derivados sugere que a presença do aditivo atue minimizando esta perda por lixiviação.

### 4.2.3 Estabilidade de armazenamento

A Figura 13 apresenta os resultados da estabilidade de armazenamento do derivado imobilizado em xerogel na presença e ausência do aditivo PVA.



A: temperatura ambiente; R: temperatura de refrigerador

**Figura 13. Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada em xerogel, com e sem adição de PVA, em temperatura ambiente e refrigerador.**

Em relação aos derivados imobilizados, todos apresentaram uma mesma tendência, com uma queda contínua na atividade residual durante o período de armazenamento, apresentando atividade residual superior a 50% após 220 dias de armazenamento. Atividade esta, em termos de desempenho de estabilidade, muito superior a observada para a enzima livre, a qual apresentou atividade residual inferior a 40% com 20 dias de armazenamento, indicando um efeito benéfico da imobilização em relação a enzima livre no que se refere a estabilidade ao armazenamento.

Em relação as condições de armazenamento observa-se um efeito negativo da temperatura, com os imobilizados armazenados em refrigeração apresentando melhor desempenho em relação aso armazenados a temperatura ambiente. A presença do PVA também se demonstrou positiva, com os derivados sintetizadas na presença de PVA apresentando melhor desempenho que os sintetizados na ausência do respectivo aditivo.

Apesar de o estudo do PVA como aditivo para imobilização enzimática não constar na literatura, o estudo de otimização realizado, encontra-se coerente com outros estudos utilizando álcool polivinílico como agente para melhorar produtos de análise

A lacase de *T. versicolor* imobilizada foi preparada em partículas magnéticas de POS-PVA onde o processo de imobilização foi otimizado. O processo mostrou-se

eficiente com redução de 65,1% no uso do teor de fenol da preparação da mistura, além de os produtos serem removidos por filtração (JORDÃO, 2010).

Yu *et al* 2018, desenvolveu um filme biodegradável composto de sílica PVA/quitosana imobilizada in situ, o qual melhorou em 45% ligações de hidrogênio entre quitosana e PVA. Reduziu ainda, o oxigênio e umidade em 25,6% e 10,2%, respectivamente o qual foi favorável para estender a vida útil do produto, mantendo assim o produto com 63% mais frescos e prolongando a vida de prateleira.

#### 4.2.4 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 xerogel com e sem a presença de PVA utilizado como aditivo (Tabela 11).

**Tabela 11. Constante de desativação térmica ( $K_d$ ), os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da lipase CALB livre e imobilizada em xerogel com e sem PVA**

| Temperatura (°C) | Enzima Livre       |       |               | Xerogel (sem PVA)  |       |               | Xerogel (com PVA)  |       |               |
|------------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|-------|---------------|
|                  | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) |
| 40               | 0,12               | 0,89  | 5,79          | 0,0819             | 0,91  | 8,46          | 0,27               | 0,85  | 2,54          |
| 60               | 0,42               | 0,89  | 1,66          | 0,2180             | 0,90  | 3,18          | 0,66               | 0,89  | 1,03          |
| 80               | 1,48               | 0,99  | 0,47          | 0,6307             | 0,93  | 1,10          | 2,66               | 0,91  | 0,26          |

Para o aditivo PVA os valores de desativação térmica e tempo de meia vida, diferentemente do observado para o derivado xerogel com PEG, indicam um efeito negativo do aditivo em relação a estabilidade térmica, com o derivado imobilizado com PVA apresentando valores de  $K_d$  superiores, o que corresponde a tempos de meia vida inferiores, inclusive em relação a enzima livre (Tabela 11).

Por exemplo, o valor de  $K_d$  obtido à temperatura de 80 °C para o derivado imobilizado com PVA (2,66) e 4,2 e 1,8 vezes superiores aos observados para o derivado imobilizado sem PVA (0,63) e para a enzima livre (1,48), respectivamente. Essa mesma tendência foi observada nas outras temperaturas avaliadas.

Os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de um biocatalisador correspondem a valores numericamente iguais ao tempo necessário para atingir uma diminuição de 50 da sua atividade enzimática inicial, respectivamente. A lipase imobilizada sem adição de PVA mostrou-se mais estável à desativação térmica que as formas livres, obtendo-se tempos de  $t_{1/2}$  na faixa de 8,46 a 1,1h.

Esta diferença em termos de funcionalidade, aliada a temperatura, pode de certa forma estar interferindo de forma negativa sobre a estabilidade da enzima, conduzindo a perda de atividade da mesma e, conseqüentemente, potencializando a inativação térmica da mesma em relação a enzima livre e ao derivado imobilizado sintetizado sem o PVA.

O efeito da temperatura na solubilidade está vinculado à quebra das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Assim, ao se aumentar a temperatura, pode ocorrer a quebra das pontes de hidrogênio com a água, levando a uma diminuição na solubilidade. Após a dissolução, o PVA mantém-se estável em solução aquosa, mesmo em temperatura ambiente (WU *et al* 2002), sendo assim a condução de calor devido a solubilidade do meio reacional faz com que o PVA, esteja auxiliando na transferência de calor, e por consequência, na desativação térmica.

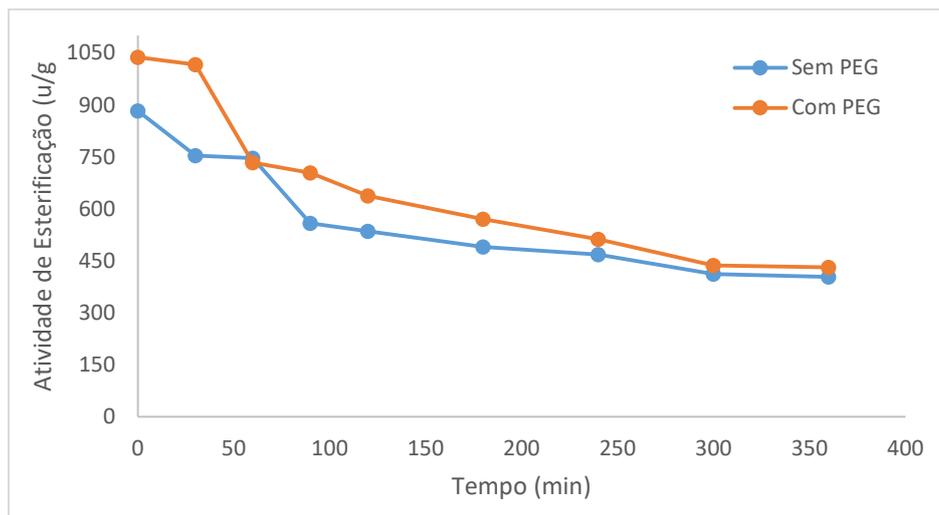
Isto pode ser explicado pelo aumento de hidrofobicidades das moléculas de PEG com a elevação da temperatura promovendo maior interação entre as macromoléculas. Em outras palavras, o aumento da temperatura irá causar uma redução de atração entre o PEG e as moléculas de água, o que resulta em um aumento da concentração deste polímero. (ZARARANI-MOATTAR e HAMZEZHARDEH, 2009; LI *et al* 2010), ou seja, o PEG é uma barreira protetora para a desativação térmica.

### **4.3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SONOGEL COM USO DE PEG**

Para o estudo do sonogel o grupo de pesquisa optou por utilizar somente o aditivo PEG, pois conforme visto nos resultados obtidos no estudo do anterior o PVA apresentou resultados em termos de estabilidade térmica inferiores aos obtidos para a enzima livre e para o derivado imobilizado sem aditivo.

#### **4.3.1 Estudo do tempo de contato ultrassônico para formação de sonogel**

Como primeiro estudo avaliou-se o efeito do tempo de secagem, fixando a frequência do ultrassom em 30 Hz, sobre a atividade dos derivados imobilizados, nomeados como sonogéis. A variação da atividade de esterificação em função do tempo de secagem obtidas para os sono géis sintetizados na presença e ausência de PEG são apresentados nas Figura 14.



**Figura 14. Atividade de esterificação do imobilizado em função do tempo de contato ultrassônico na formação de sonogel sem a presença de e com adição de PEG**

Ambos os derivados apresentaram uma mesma tendência, com uma perda de atividade de esterificação com o tempo de secagem no ultrassom. Esta perda de atividade foi mais acentuada nos 60 minutos iniciais, a partir do qual a mesma tende a uma estabilização. Neste contexto para a continuidade dos ensaios, os quais visaram a otimização do processo mediante o emprego de um planejamento DCCR, fixou-se o tempo de secagem em 90 minutos.

No que se refere a secagem ultrassônica, estudo realizados por Huang *et al.* (2001), demonstraram que, em comparação com agitação magnética, a alta intensidade das vibrações ultrassônica podem proporcionar uma diminuição da mesoporosidade dos xerogéis. Neste estudo os autores observaram uma diminuição da porosidade de cerca de 17,2% a 11,6%, quando comparados com amostras utilizando agitação magnética durante a preparação do sol.

A diminuição da mesoporosidade quando relacionada com vibração ultrassônica também pode ser atribuída a hidrólise do aditivo e o subsequente processo de condensação, conduzindo a formação de partículas coloidais maciças.

Em relação aos valores referentes ao tempo de secagem obtidos no presente trabalho, os mesmos estão coerentes com a literatura Huang *et al.* (2001).

### 4.3.2 Influência da temperatura de secagem e da potência do banho ultrassônico na atividade de esterificação do imobilizado

Para a síntese do derivado imobilizado em sonogel também foi avaliado um DCCR 2<sup>2</sup>. As variáveis, temperatura de secagem e frequência ultrassônica, foram estudadas a fim de se obter a máxima atividade de esterificação. Os resultados obtidos para cada experimento realizado encontram-se apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12. Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica na atividade de esterificação do mobilização em sonogel.**

| Experimento | X <sub>1</sub> (Hz) | X <sub>2</sub> (°C) | Atividade AE ± DPad |
|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1           | -1 (10)             | -1 (20)             | 386,6 ± 12,3        |
| 2           | -1 (10)             | +1 (50)             | 161,2 ± 79,1        |
| 3           | +1 (50)             | -1 (20)             | 164,0 ± 18,9        |
| 4           | +1 (50)             | +1 (50)             | 127,7 ± 191,9       |
| 5           | -1,41 (1,8)         | 0 (30)              | 320,2 ± 44,4        |
| 6           | +1,41 (58,2)        | 0 (30)              | 228,0 ± 35,9        |
| 7           | 0 (30)              | -1,41 (13,8)        | 341,0 ± 31,0        |
| 8           | 0 (30)              | +1,41 (56,15)       | 112,3 ± 86,9        |
| 9           | 0 (30)              | 0 (35)              | 500,1 ± 54,9        |
| 10          | 0 (30)              | 0 (35)              | 508,1 ± 39,2        |
| 11          | 0 (30)              | 0 (35)              | 504,1 ± 55,2        |

X<sub>1</sub>: Frequência Ultrassônica; X<sub>2</sub>: Temperatura de secagem (ultrassom).

Analisando de forma independente as variáveis podemos perceber um efeito negativo de ambas as variáveis estudadas sobre a atividade de esterificação, com os ensaios conduzidos com os níveis inferiores (-1) apresentando maiores atividades em relação aos conduzidos com os níveis superiores (+1). Para ilustrar, podemos citar o aumento de 2,25 vezes na atividade observada entre os ensaios 4 (127 U/g), empregando os níveis superiores (+1) e 1 (386 U/g), empregando os níveis inferiores (-1).

Também podemos perceber que quando diminuimos, de forma independente, a temperatura (ensaios 1 e 2, 3 e 4), e a frequência (ensaios 1 e 3, 2 e 4), proporcionamos um aumento na atividade de esterificação.

No entanto as maiores atividades, com  $\cong 505$  U/g, foram verificadas no ponto central, o qual foi sintetizado nas condições intermediárias sugerindo a otimização do processo de secagem, ou seja, de síntese do derivado imobilizado em sonogel.

Em termos de atividade, o derivado imobilizado em sonogel, com  $\cong 505$  U/g, apresentou uma atividade 1,3 vezes superior a observada para o derivado imobilizado com PEG obtido pelo método xerogel, com  $\cong 394$  U/g.

A aplicação de ultrassom em enzimas pode produzir um efeito positivo na atividade enzimática, embora ultrassom de intensidade possa causar desnaturação (MASON *et. al.*, 2000, SINISTERRA, 1992).

Estudos realizados demonstram que o uso do ultrassom pode aumentar a atividade de certas enzimas. O efeito do ultrassom sobre as enzimas depende fundamentalmente da frequência, intensidade e duração da irradiação.

Wang *et. al.* (2011) estudaram as condições ótimas de frequência e intensidade de ultrassom na atividade da enzima allinase de alho fresco, e concluíram que em 40 kHz e intensidade de 0,5 W/cm<sup>2</sup> há um aumento da atividade da enzima com o uso do ultrassom de 47,1 % em comparação com o controle (sem irradiação ultrassônica) e sugeriram que esta melhoria se deve ao fato de baixas frequências e intensidades de ultrassom produzirem cavitação estável, que por sua vez produz uma reação mais homogênea e aumenta a transferência de massa, favorecendo o movimento dos reagentes ao sítio ativo da enzima, e por último que a cavitação ultrassônica produz grupamentos hidroxilas que reagem com as moléculas intermediárias produzidas pela enzima, reduzindo a inibição da mesma.

Os dados experimentais obtidos no DCCR 2<sup>2</sup> foram tratados por análise de variância. A Tabela 13 apresenta o coeficiente de regressão e erro padrão, e valores de t e p para a atividade de esterificação a um nível de confiança de 95 %:

**Tabela 13. Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de t e p do DCCR 2<sup>2</sup> da imobilização em sonogel em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica para a atividade de esterificação.**

| Fonte de Variação | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t      | p     |
|-------------------|--------------------------|-------------|--------|-------|
| Média             | 504,32                   | 2,35        | 214,89 | 0,000 |
| X1 (L)            | -49,10                   | 1,44        | -34,12 | 0,001 |
| X1 (Q)            | -131,92                  | 1,72        | -76,81 | 0,000 |
| X2 (L)            | -54,86                   | 1,44        | -38,11 | 0,001 |
| X2 (Q)            | -130,62                  | 1,72        | -76,05 | 0,000 |
| X1.X2             | 47,29                    | 2,03        | 23,27  | 0,002 |

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, todos os fatores avaliados foram estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) no que se refere à atividade de esterificação dos imobilizados. Observa-se também que as duas variáveis (temperatura de secagem e frequência ultrassônica) têm efeito positivo sobre esta, o que indica que aumento no volume de água e na concentração de enzima e PEG afetarão positivamente a atividade.

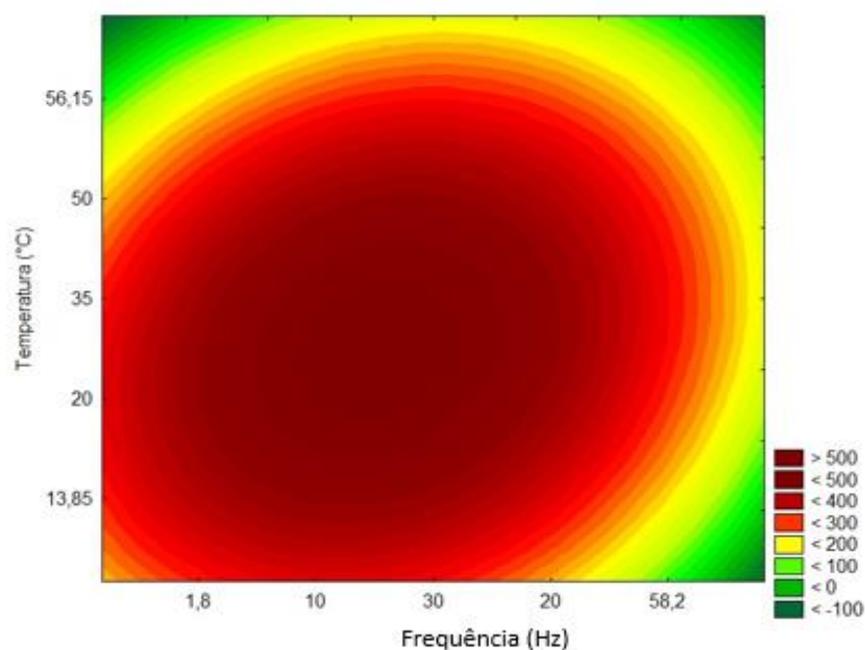
A Tabela 14 apresenta a análise de variância e demonstra que se obteve um coeficiente de regressão de 0,95 e F calculado maior que F tabelado, permitindo, dessa forma, a construção do modelo matemático (Equação 7) e da curva de contorno (Figura 15).

**Tabela 14. Análise de variância dos resultados obtidos no DCCR 2<sup>2</sup> da imobilização em sonogel em função das variáveis temperatura de secagem e frequência ultrassônica.**

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor F <sub>calc</sub> | p-valor |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------------------|---------|
| Regressão         | 201679,69          | 5                  | 40335,9        | 18,30                   | 0,0001  |
| Resíduo           | 11017,87           | 5                  | 2203,57        |                         |         |
| Total             | 212697,56          | 10                 |                |                         |         |

$$AE = 476,59 + 129,92x_1 - 92,04x_1^2 + 30,68x_2 - 127,01x_2^2 - 25,00x_1x_2$$

Na Figura 15, para as variáveis frequência ultrassônica e temperatura da reação, observa-se que esta tende a valores ótimos em valores próximos ao ponto central do planejamento ( $\pm 500$  U/g).



**Figura 15. Curva de contorno para as variáveis frequência ultrassônica e temperatura da reação na imobilização em sonogel**

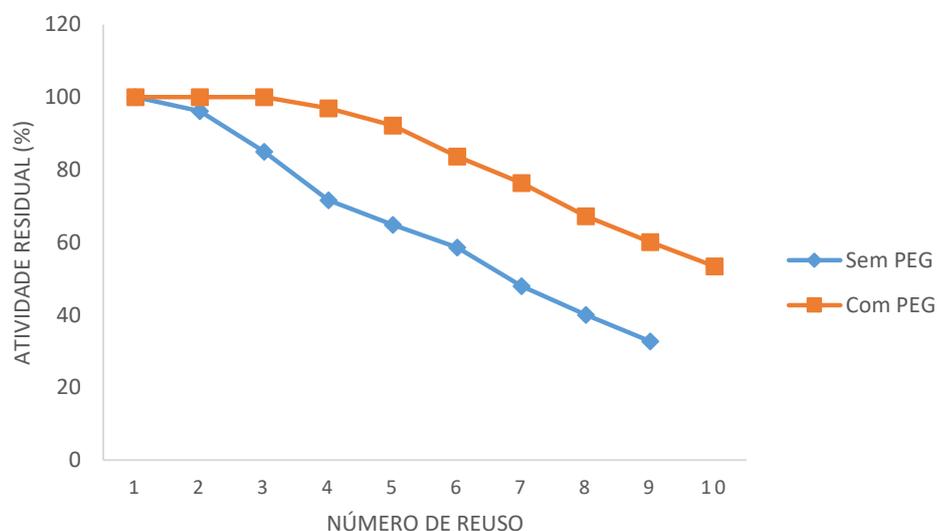
A frequência ultrassônica ( $X_1$ ) e temperatura ( $X_2$ ) para máxima atividade de esterificação foi calculada por meio da solução de um sistema linear de ordem  $2 \times 2$ . Este sistema foi obtido pelas derivadas parciais do modelo em relação as duas variáveis e igualadas a zero. As atividades de esterificação máximas da lipase imobilizada foram obtidas nos níveis codificados  $-0,23126$  e  $-0,25185$  para frequência e temperatura, respectivamente. Esses níveis codificados correspondem aos valores  $20$  Hz da frequência ultrassônica e  $30^\circ\text{C}$  de temperatura de secagem.

Nova imobilização enzimática foi realizada utilizando os valores obtidos como ótimos no planejamento e a atividade de esterificação deste imobilizado encontrada experimentalmente ( $504,9$  U/g) correspondeu ao valor teórico do modelo, validando-o, tendo um rendimento de imobilização de  $516,9\%$ .

#### 4.3.3. Estabilidade operacional

Assim como no estudo do xerogel, o imobilizado em sonogel também foi estudado com relação a estabilidade operacional ou reuso nas condições ótimas do planejamento

experimental (20 Hz da frequência ultrassônica e 30°C de temperatura de reação). A Figura 16 apresenta a atividade residual e o número de ciclos realizados com o suporte.



**Figura 16. Reuso da enzima imobilizada em sonogel, com e sem PEG.**

Observa-se na Figura 16 que o número de ciclos obtidos, considerando 50% da atividade inicial, chegou a 10 para o imobilizado com a presença do aditivo PEG 1500. Já para o imobilizado sem a presença do aditivo o número de ciclos com atividade residual proposta foi de 6.

A diferença do desempenho observado entre o sonogel e o xerogel, foi vinculada a irradiação ultrassônica, a qual ao intensificar o rompimento físico do suporte, facilita a lixiviação da enzima do mesmo, contribuindo assim para a perda de atividade do imobilizado (CENI *et al.*, 2011; BANSODE e RATHOD, 2014; WAGHMARE e VETAL, 2015).

Em termos de derivado imobilizado em sonogel há poucos dados reportados na literatura em termos de estabilidade operacional (número de ciclos) dos imobilizados obtidos empregando o ultrassom na etapa de secagem/síntese. Neste sentido, para fins comparativos buscamos referências onde o ultrassom é empregado na etapa reacional.

Adewale *et al.* (2015) em sistema ultrassônico empregando a lipase de *Candida antarctica* B (CALB) na transesterificação de biodiesel (6% de catalisador, 20 minutos e potência ultrassônica de 40% a 5 Hz) apresentou 3 e 5 ciclos com 40% em relação a inicial.

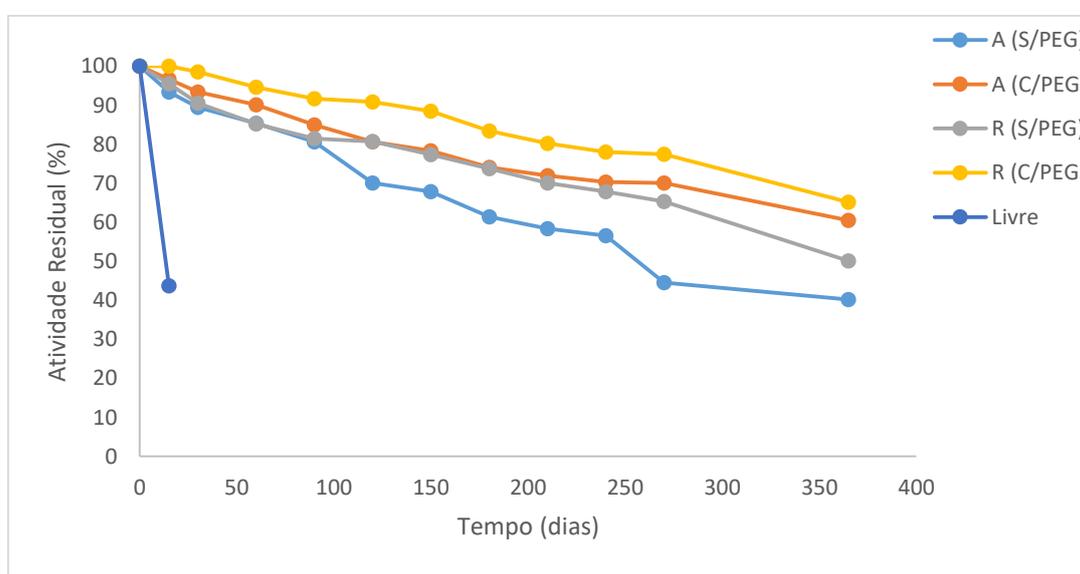
Michelin *et al.* (2015) na síntese de ésteres etílicos a partir de ácidos graxos (FAEE) por meio de óleo de Macaúba (*Acrocomia Aculeata*) e de óleo de coco (MCO), sem solvente, usando a lipase imobilizada (Novozym 435) sob a influência do ultrassom (frequência de  $\approx 132$  W, 100% de potência ultrassônica, 20% de catalisador, 65°C em 30 minutos de reação) com 5 ciclos de reutilização com 50% em relação a inicial.

Khan *et al.* (2015) na síntese de oleato de cetila em sistema ultrassônica (60°C, 5% de catalisador, potência ultrassônica de 60%, frequência de ultrassom de 25 kHz em 30 minutos) e mecânica (2 horas) empregando a lipase comercial *Candida antarctica* lipase B CALB <sup>TM</sup>10000 obteve 1 ciclo com 80% em relação a inicial no sistema ultrassônica.

#### 4.3.4 Estabilidade de armazenamento

A Figura 17 descreve o comportamento da atividade residual (AR) de esterificação para os sonogéis imobilizados, armazenados a temperatura ambiente e refrigeração, respectivamente.

A estabilidade de estocagem por longos períodos é um dos principais fatores a serem considerado quando se utiliza lipases imobilizadas.



A: temperatura ambiente; R: temperatura de refrigerador

**Figura 17. Estabilidade de estocagem da enzima imobilizada em sonogel, com e sem PEG, em temperatura ambiente e refrigerador**

Na Figura 17 observa-se que após 365 dias com exceção do imobilizado armazenado em temperatura ambiente e sem a dição de PEG não se manteve com

atividade residual acima de 50%, os demais ainda apresentam-se com atividade acima da estipulada para esse estudo, mesmo comportamento observado para o xerogel.

Independente da condição de armazenamento a enzima imobilizada no sonogel, apresentou um maior tempo de estocagem quando comparado com a enzima livre. Em relação aos sonogéis imobilizados, todos apresentaram comportamento semelhante, com uma AR superior a 50% por 365 dias de armazenamento, tanto em temperatura ambiente quanto em refrigeração.

Entre as condições de estocagem as amostras armazenadas em refrigeração, apresentam melhor desempenho que suas pares armazenadas a temperatura ambiente.

### 4.3.5 Estabilidade térmica

Para o sonogel a estabilidade térmica também 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 (Tabela 8).

**Tabela 15. Constante de desativação térmica ( $K_d$ ), os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da lipase CALB imobilizada em sonogel com e sem PEG 1500**

| Temperatura (°C) | Enzima Livre       |       |               | Sonogel (sem PEG)  |       |               | Sonogel (com PEG)  |        |               |
|------------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|-------|---------------|--------------------|--------|---------------|
|                  | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$ | $t_{1/2}$ (h) | $K_d$ ( $h^{-1}$ ) | $R^2$  | $t_{1/2}$ (h) |
| 40               | 0,12               | 0,89  | 5,79          | 0,1009             | 0,99  | 5,98          | 0,099              | 0,9768 | 6,86          |
| 60               | 0,42               | 0,89  | 1,66          | 0,2906             | 0,99  | 2,11          | 0,3285             | 0,9021 | 2,38          |
| 80               | 1,48               | 0,99  | 0,47          | 1,07               | 0,81  | 0,63          | 1,0867             | 0,8957 | 0,64          |

A mesma tendência observada para os xerogel com o uso de PEG como aditivo foi obtida para o sonogel, ou seja, o imobilizado com e sem a presença PEG como aditivo apresentaram valores de  $K_d$  menores e tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) maiores aos obtidos para a enzima. Indicando o mesmo comportamento do suporte de xerogel. Da mesma forma o uso do PEG como aditivos quando comparado aos suportes puros, apresentam aumento do tempo de meia vida e redução do valor da  $K_d$ .

De um modo geral, constatou-se que o aumento da temperatura afeta negativamente a o processo de desativação térmica dos derivados enzimáticos estudados. Porém, foi observado que a velocidade com que acontece a inativação (representada pela constante  $K_d$ ) do derivado imobilizado é muito menor se comparada com a livre livre. O baixo valor de  $K_d$ , o qual é proporcional à concentração de enzima ativa presente,

lipase imobilizada sugere que o processo de imobilização da lipase em sonogel tanto na presença do aditivo com sem a adição do mesmo protegeu à enzima da inativação térmica na faixa de temperatura de 40 °C.

A lipase imobilizada em sonogel mostrou-se mais estável à desativação térmica que as formas livres, obtendo-se tempos de  $t_{1/2}$  de 5,98 e 6,86 h sem adição de PEG, com adição de PEG respectivamente, para a temperatura de 40°C.

Neste caso, o tempo de meia vida foi inferior ao observado no xerogel, este fato pode ser atribuído a forma de secagem do gel. Onde para o estudo do sonogel, a atividade enzimática foi na maioria dos estudos menor do que a observada no xerogel.

#### **4.3.6 Considerações Parciais**

Os resultados apresentados neste capítulo demonstraram que a utilização de um planejamento experimental, como o DCCR, provou ser uma ferramenta importante para otimizar o processo de imobilização pela técnica sol-gel com o uso de PEG como aditivo para maximizar a atividade do suporte imobilizado.

Quando se fez o estudo do xerogel com o uso do aditivo PEG 1500, este apresentou o melhor desempenho na AE quando se estudou a estabilidade operacional (21 ciclos) e térmica quando comparado ao sonogel utilizando este mesmo aditivo. Ou seja, obteve-se 21 ciclos para o xerogel e 10 para o sonogel. Já no estudo da estabilidade térmica a diferença do tempo de meia vida foram de 6 horas do xerogel para o sonogel com o uso do aditivo PEG.

Para o estudo da estabilidade de armazenagem ambos quase todos os imobilizados (xerogel e sonogel) mantiveram com atividade residual em torno de 50% após 365 dias.

Observa-se uma diferença nos estudos de estabilidade operacional e estabilidade térmica entre o xerogel em comparação ao sonogel, este fato pode ser atribuído ao tratamento de secagem pelo ultrassom, que faz com que a mesoporosidade do suporte seja afetada, e conseqüentemente, o sistema reacional tenha menos acesso aos sítios ativos da enzima imobilizada. Outra possível causa desta diferença, pode vir a ser, que a secagem esteja ocasionando cavitações no suporte, afetando assim sua capacidade reacional e térmica.

Já no processo de imobilização sem o aditivo PEG 1500, tanto o sonogel quanto o xerogel não apresentaram diferença relevante quando se comparou a atividade de esterificação.

## **CAPÍTULO VI**

## **CONCLUSÕES**

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos desafios na área de imobilização enzimática é o uso de conceitos relativos à estabilidade do imobilizado, como por exemplo, relacionado ao uso de aditivos na imobilização e/ou mudança dos processos para a obtenção do suporte imobilizado.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo demonstram a importância do estudo dos diferentes aditivos e métodos de secagem para imobilização da lipase CALB na imobilização enzimática pela técnica sol-gel. No que diz respeito a obtenção do xerogel com PEG e do xerogel com PVA e do sonogel com uso do aditivo PEG imobilizados, observou-se a importância da otimização das condições de imobilização e secagem, além do estudo das estabilidade operacional, de armazenamento e térmica.

A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, pode-se concluir que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados, ou seja, a imobilização da enzima lipase por uma nova metodologia com o estudo do uso de diferentes aditivos e métodos de secagem. Na busca por estratégias de imobilização mais eficientes, que utilizem um número reduzido de etapas, e, além disso, aumente a estabilidade operacional da enzima imobilizada indiferentemente do aditivo utilizado no processo de imobilização, insere-se o objetivo deste trabalho que visa contribuir para o campo de conhecimento de imobilização enzimática pela técnica sol-gel, propondo-se mediante a utilização de diferentes aditivos e formas de secagem. Os resultados obtidos demonstram o possível uso como substituinte nos processos químicos convencionais em aplicações industriais.

Por fim o estudo em questão mostrou-se eficiente para os diferentes suportes e aditivos utilizados nos estudos. Ainda, percebeu-se resultados superiores aos encontrados na literatura até o momento.

## **5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

A partir dos resultados obtidos até o momento, propõem-se para as etapas seguintes do trabalho:

- Testar os xerogéis e sonogéis com TMOS como precursor da sílica com outros aditivos para imobilização (exemplo Líquidos iônicos).
- Verificar o potencial de aplicação da CALB imobilizada em reações de produção de ésteres aromáticos.

## 5.2 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABDELMAJEED, N. *et al.* Immobilization technology for enhancing bio-products industry, **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13528-13539, 2012.
- ADEWALE P., DUMONT M. J. e NGADI M. Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic-assisted biodiesel production from waste tallow. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, n. 1, p. 1, 2015.
- ALFAYA, A.; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**. 25: 835-841, 2002.
- ÁLVAREZ, V.; H., MATTEDI, S.; MARTIN-PASTORD, M.; AZNARB, M.; IGLESIAS, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. **Fluid Phase Equilibrium**. 229: 42–50, 2010.
- ANDRADE, L.H.; REBELO, L.P.; NETTO, C.G.C.M.; TOMA, H.E. Kinetic resolution of a drug precursor by Burkholderia cepacia lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 66:55-62, 2010.
- 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.
- BADJIC, J.D, KOSTIC, N.M. Effects of encapsulation in sol-gel silica silica glass on esterase activity, conformational stability and unfolding of bovine carbonic anhydrase II. **Chemistry Mater**, 11:3671-3679,1999.
- BANSODE S. R. e RATHOD V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of Isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1297, 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.
- BARBOSA, J.M.P. *et al.* Purification of lipase produced by a new source of Bacillus in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography**, v. 879, p. 3853-3858, 2011.
- 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.
- BATISTELLA, L.; USTRA, M.K.; RICHETTI, A.; PERGHER, S.B.C.; TREICHEL, H.; J.V. OLIVEIRA, J.V.; LERIN, L.; DE OLIVEIRA, D.. Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 351–358, 2012.

- BENNADJI, F. G., ZIMOVA, J., LAVAL, J. P., BLANCHART, P. Mullite interaction with bismuth oxide from minerals and sol-gel processes. **Ceramics International**, 36, 129-134, 2010.
- BERGER, C., SONG, Z., LI, T., LI, X., OGBAZGHI, A. Y., FENG, R., e DEE HEER, W. A. Ultrathin epitaxial graphite: 2D electron gas properties and a route toward graphene-based nanoelectronics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.108, p. 19912-19916, 2004.
- 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.
- 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.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: GUIBAN, J.M. Immobilization of Enzymes and Cells. **Third Edition. United State: Humana Press**, 2013.
- BRÍGIDA, A. I. S. Estudo da imobilização de lipase tipo B de Candida antarctica utilizando fibra de casca de coco verde como suporte. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2006.
- BRÍGIDA, A.; PINHEIRO, Á.; FERREIRA, A.; GONÇALVES, L. Immobilization of Candida antarctica lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Applied 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.
- BUGA, M.; IBRAHIM, S.; NOK, A. Physico-chemical characteristics of immobilized polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6), **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 52, p. 8934-8943, 2010.
- BUMMER, P. M. Chemical considerations in protein and peptide stability. 2nd ed. North Carolina: Pharmaceutech, 2008, p 7-42.
- CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. Engenharia Enzimática. Ed. Lidel- Edições Técnicas, Lisboa, 2003.
- CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C.; FATTOR, D.; SPIZZO, P.; GARDOSSE, L. Efficient immobilization of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilization methods. **Chemical. Society. Reviews**, v.42, p.6262, 2013
- CAO, X.; YANG, J.; SHU, L.; YU, B.; YAN, Y. Improving esterification activity of Burkholderia cepacia lipase encapsulated in silica by bio imprinting with substrate analogues. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 177-182, 2009.
- CARAMORI, G. F., MOLINA, E. F., PARREIRA, R. L., DE FARIA, E. H., DE CARVALHO, H. W. P., COIMBRA, D. F. e CIUFFI, K. J. Ureasil-Poly (ethylene oxide) Hybrid Matrix for Selective Adsorption and Separation of Dyes from Water. **Langmuir**, v. 30, p. 3857-3868, 2014.

- CARVALHO N. B., LIMA Á. S. e SOARES C. M. Use of modified silicas for lipase immobilization. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399, 2015.
- CARVALHO, N. B.; BARBOSA, J. M. P.; OLIVEIRA, M. V. S.; FRICKS, A. T.; LIMA A. S.; SOARES, C. M. F. Biochemical properties of Bacillus sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol-gel process. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 52-58, 2013.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CENI G., DA SILVA P. C., LERIN L., CHARIN R. M., OLIVEIRA J. V., TONIAZZO G., TREICHEL H., OESTREICHER E. G. E. e DE OLIVEIRA D. Enzyme-catalyzed production of 1-glyceryl benzoate in compressed n-butane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 513, 2010.
- CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.
- COSTA-JUNIOR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/ poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.
- CRUZ JÚNIOR, A. Imobilização de lipase de Candida antarctica B em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2007.
- DA SILVEIRA, T., AWANO, C. M., DONATTI, D. A., DE VICENTE, F. S., e VOLLET, D. R. About the thermal stability and pore elimination in the ordered hexagonal mesoporous silica SBA-15. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.190, p.227-233, 2014
- DENG, X.; FANG, Z.; LIU, Y.; YU, C. Production of biodiesel from Jatropha oil catalyzed by nanosized solid basic catalyst. **Energy**, v. 36, n. 2, p. 777–784, 2011.
- DUMITRIU, E.; SECUNDO, F.; PATARIN, J.; FECHETE, I. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 119-133, 2003.
- ELLERBY, L. M. 1. NISHIDA, C.R. NISHIDA, F. YAMANAKA, S. A. DUNN, B. Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method. **Science**, v. 255, p. 1113-1115, 1992
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. New York: Springer, 2004.
- FAJARDO-OCHOA, R. *et al.* Inmovilización de células y enzimas, **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 3, n. 6, p. 42-56, 2011.
- FEITOSA, M. A. F. **Compatibilização de blenda polimérica de poliamida 6,6/polietileno de baixa densidade utilizando radiação ionizante de feixe de elétrons. Dissertação de mestrado.** Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2008.

- FERNANDES, D. M. **Estudo da estabilidade térmica de blendas de álcool poli(vinílico)/ lignina modificada**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR, 2005.
- 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
- FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.; COCCA, J.; MATEO, C.; MORO, P.; TERRENI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. Regio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis. **Tetrahedron**, v. 59, n. 30, p. 5705-5711, 2003.
- FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.
- FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.
- 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.
- FICANHA, M. M. A. Imobilização da lipase *Candida antarctica* B (CalB) em sílica xerogel e aerogel obtidos pela técnica sol-gel na presença dos aditivos polietilenoglicol e líquidos iônicos. **Tese (Doutorado em Engenharia Alimentos)** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, 2017.
- FICANHA, M. M. A. Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B (CalB) pela técnica de sol - gel. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos)** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, 2014.
- 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.
- FREITAS, L. **Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**. (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena 2006.
- GANDHI, Neena N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.
- GAO, Y. I. HEINEMANN, A. KNOTT, R. BARLETT, J. Encapsulation of protein insilica matrices: structural evolution on the molecular and nanoscales. **Langmuir**, v. 26, p. 1239-1246, 2010.

- GERARDIN, C.; REBOUL, J; BONNE, M.; LEBEAU, B. Ecodesign of ordered mesoporous silica materials. **Chemical. Society. Reviews**, v. 42, p. 4217, 2013
- GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. **Chirality Program**, v.17, p.1-15, 2005.
- GONÇALVES, A.M.; SCHACHT, E.; MATTHIJS, G.; BARROS, M.R.A.; CABRAL, J.M.S.; GIL, M.H. Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. **Enzyme Microbiology**. Tech. 24: 60-66, 1999.
- GRANDA, K. M. *et al.* Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n. 1, 2008.
- HALLING, P. J. High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. **Biochemistry Biophys Acta**, v.1040, p.225, 1990.
- 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.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.: 235-251, 2006.
- HASEGAWA, S.; AZUMA, M.; TAKAHASHI, K. Enzymatic esterification of lactic acid, utilizing the basicity of particular polar organic solvents to suppress the acidity of lactic acid. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 83, p.1503-510, 2008.
- HENCH, L.L.; WEST, J.K. The sol-gel process. **Chemistry Revive**. 90: 33-72, 1990.
- HERRINGTON, R.; HOCK, K. Dow polyurethanes flexible foams, 2 ed. Midland MI: **Dow Chemical Publications**, 1997.
- HIRATSUKA, R. S., SANTILLI, C. V., PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, 18, 171-180, 1995.
- HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O Processo Sol-Gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1995.
- HONAISSER, T. C. Estudo da imobilização da lipase NS-40116 (*Thermomyces lanuginosus*) utilizando a técnica sol-gel. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões/Campus de Erechim – RS, 2017.
- 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.
- ILER, R. K., The Chemistry of Silica, Wiley, New York, p.365, 1979.
- ILLANES, A. Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications, Chile: Springer, p. 398, 2008,
- INGERSOLL, C.M. e BRIGHT, F.V. Using sol–gel-based platforms for chemical sensors. **Chemtech**, v. 27, p. 26–31. 1997.

- ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 543, 2009.
- IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://www.iubmb.org/>>. Acesso em: 16/01/2019.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipase. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JORDÃO, C. C. R. Imobilização de lacase a partículas magnéticas de polisiloxano-álcool polivinílico. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- KAKIHANA, M. Invited Review “sol-gel” preparation of high temperature superconducting oxides. **Journal of sol-gel science and technology**, 6, 7-55, 1996.
- KAZANDJIAN, R. Z.; DORDICK, J. S.; KLIBANOV, A. Enzymatic analyses in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p.417, 1986
- KHAN N. R., JADHAV S. V. e RATHOD V. K. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, n.1, p. 522, 2015.
- 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.
- KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica* : Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research e Development**, v. 6, p. 446-451, 2002.
- LASSALLE, V. L.; FERREIRA, M . L. Lipase-catalyzed synthesis of polylactic acid: an overview of experimental aspects. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology and Genetic Reviews Biotechnology**; v. 83, p. 1493–1502, 2008.
- LI, Y.; WANG, L-S.; CAI S-F. Mutual Solubility of Alkyl Imidazolium Hexafluorophosphate Ionic Liquids and Water. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, p. 5289- 5293, 2010.
- LIESE, A.; HILTTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical. Society. Reviews**, v.42, p.6236, 2013.
- LIMA, A. W. O. e ANGNES, L. Biotálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química. Nova**, v.22, n.2, 1999.
- LIMA-BARROS, A.E. *et al.* Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 459-463, 2002.
- LOZANO, P.; PÉREZ-MARIN, A.; DIEGO, T. D.; GÓMEZ, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M.; RIOS, G.; IBORRA, J. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. **Journal of Membrane Science**, v. 201, n. 1, p. 55-64, 2002.

- 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. *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.
- MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases., v. 3, Intercept Ltd., 1985.
- 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.
- MASON, T. J. Large scale sonochemical processing: aspiration and actuality. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 145-149, 2000.
- MAUGARD, T.; LEGOY, M. Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin a in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, n. 4, p. 275-280, 2000.
- MCCABE, R.; RODGER, A.; TAYLOR, A. A study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 70-74, 2005.
- MICHELIN S., PENHA F. M., SYCHOSKI M. M., SCHERER R. P., TREICHEL H., VALÉRIO A. e OLIVEIRA J. V. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. **Renewable Energy**, v. 76, n. 1, p. 388, 2015.
- 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.
- 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.
- 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.
- NUNES, G. F. M. *et al.* Modificações bioquímicas da gordura de leite. **Química Nova**, v. 33, p. 431-437, 2010.
- ORREGO, C. E.; SALGADO, N.; VALENCIA, J. S.; GIRALDO, G. I.; GIRALDO, O. H.; CARDONA, C. A. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. **Carbohydrate polymers**, v.79, p. 9, 2010.
- PALOMO, J. M.; MUNOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, p. 279 -286, 2002.

- PALOMO, J. M.; SEGURA, R.; MATEO, C.; TERRENI, M.; GUIBAN, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. **Tetrahedron**, v. 16, n. 4, p. 869-874, 2005.
- PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Tech.** 40:1451–63, 2007.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119, 1999.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- 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.
- PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A. Mass Transfer Characteristics of Immobilized Cells Used in Fermentation Processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 237, 1998.
- PIROZZI, D.; GRECO, G. Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 2, p. 94-100, 2004.
- 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.
- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.
- REETZ, M. T.; TIELMANN, P.; WISENHOFER, W.; KONEN, W.; ZONTA, A. Second Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts. **Advanced Synthesis and 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.
- ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA F. A. P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 61-67, 1998.
- ROCHA, J.M.S.; GIL, M.H.; GARCIA, F.A.P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 61-67, 1998.
- RODRIGUES, D.; MENDES, A.; ADRIANO, W.; GONÇALVES, L.; GIORDANO, R. Multipoint 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.

- ROSS, N. W.; SCHNEIDER, H. Activities of *Candida rugosa* lipase and other esterolytic enzymes coated on glass beads and suspended in substrate and water vapor: Enzymes in thin liquid films. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.370, 1991.
- SARDA, L.; DESNUELE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 58, p. 513-521, 1958.
- SCHWAB, L. W.; KROON, R.; SCHOUTEN, A. J.; LLOOS, K. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of unsubstituted  $\beta$ -lactam. **Macromolecular Rapid Communication**, v.29, p.794–797, 2008.
- 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.
- SHARMA, R.; CHISTRY, Y.; BANERJEE, U. C. Production purification, characterization and application of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p.627-662, 2001.
- SILVA, F.M.; LACERDA, P.S.B.; JUNIOR, J.J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**. 28: 03-110, 2005.
- SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. **Imobilização de fungos produtores de lipase intracelular em esponjas de poliuretano**. Anais do simpósio nacional de bioprocessos - SHEB, Natal – RN, 2009.
- SILVA, G. S; BRUNO, L. M.; DE CASTRO, H. F. **Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular**. Anais do simpósio nacional de bioprocessos–SINAFERM, Natal – RN, 2009.
- SILVA, J.; MACEDO, G.; RODRIGUES, D.; GIORDANO, R.; GONÇALVES, L. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogéis using different support activation strategies. **Journal Biochemical Engineering**, v. 60, p. 16-24, 2012.
- SINISTERRA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonic**, v. 30, n. 3, p. 180- 185, 1992.
- 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.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Selection of Stabilizing Additive for Lipase Immobilization on Controlled Pore Silica by Factorial Design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 91-93, p. 703-718, 2001.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in the presence of polyethylene glycol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p.863-874, 2002.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M. Imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de proteínas não enzimáticas. In: **XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais do XIII COBEQ**, Campinas-SP,2000.

- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 832-838, 2003.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS O.A.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p.307-319, 2004.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O.A.; DE CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 39: 69-76, 2006.
- SOARES, S, M. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia – USP, Lorena – SP, 2012.
- SOUZA, R. L. Emprego de aditivos na imobilização sol-gel de lipases. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes- UNIT, Aracaju, 2012.
- STRAATHOF, A.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.
- TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p.8, 2012
- TAN, T. *et al.* Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.
- THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 40074-40083, 2005.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HASS, M. J. C. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.
- VOLLET, D. R., DONATTI, D. A., RUIZ, A. I. De CASTRO, W. C. Structural study of aged saturated silica gels obtained from tetramethoxysilane sonohydrolysis with different water/tetramethoxysilane molar ratio. **Physical Review B**, v.67, p. 184-207, 2003.
- WAGHMARE G. V., VETAL M. D. e RATHOD V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, n. 1, p. 311, 2015.
- WANG, J., CAO, Y., SUN, B., WANG, C., MO, Y. Effect of ultrasound on the activity of aliinase from fresh garlic. **Ultrasonics sonochemistry**. v. 18, p. 534-540, 2011.
- WINLKER, F. K.; GUBERNATOR, K. Lipases - their structure, biochemistry and application. **Cambridge University Press**: Cambridge, 1994.

- WU, C.L., ZHANG, M.Q., RONG, M.Z., FRIEDRICH, K. Tensile Performance Improvement of Low Nanoparticles Filled-polypropylene Composites, **Composite Science and Technology**, 62: 1327-1340, 2002.
- YAMANE, T.; KOJIMA, Y.; ICHIRYU, T.; NAGATA, M.; SHIMIZU, S. Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene: Factors affecting activity of pure enzyme. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 10, p. 1063-1069, 1990.
- 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.
- YU, Z.; LI, B; CHU., J, ZHANG., P. Silica *in situ* enhanced PVA/chitosan biodegradable films for food packages. **Carbohydrate Polymers**, v.184, p. 214-220, 2018.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p. 3194, 1988.
- ZANETTE, A. F.; AWADALLAK, J.; FILHO, L.C. Imobilização de lipases regioseletivas em matrizes sol-gel e reação parcial de hidrólise. **Journal of Exact Sciences**, v.3, n.1, p.05- 08, 2014.
- ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. Thermal stability and energy of deactivation of free and immobilized amyloglucosidase in the saccharification of cassava starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 72, p.383-394, 2011.
- ZARARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEHZADEH, S. Phase Diagrams for the Aqueous Two-Phase System Containing the Ionic Liquids 1-Butyl-3-methylimidazolium Bromide and Tri-potassium Citrate at T = (278,15, 298,15, and 318,15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 54, p. 833-841, 2009.
- ZARCULA C.; CORÍCI, L.; CROITORU, R.; URSOIU, A.; PETER, F.; 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.
- ZHANG, G., FU, Z., WANG, Y., WANG, H., WANG, W.,ZHANG, J., LEE, S.W., NIIHARA, K. Boron-doped mullite derived from single-phase gels. **Journal of the European Ceramic Society**, 30, 2435-2441, 2010.
- ZIBIOLO, 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.