UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PATRICIA ALEJANDRA MENDOZA ORTIZ

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE UM BIOSSURFACTANTE POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO – OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

BELO HORIZONTE - MG
2020

PATRICIA ALEJANDRA MENDOZA ORTIZ

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE UM BIOSSURFACTANTE POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO – OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.
Linha de Pesquisa: Tecnologias limpas, materiais e nanotecnologia
Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Co-orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Crén

BELO HORIZONTE – MG
2020

Mendoza Ortiz, Patricia Alejandra.
M539s Síntese enzimática de um biossurfactante por esterificação em meio orgânico – otimização, caracterização estrutural e avaliação de sua atividade antimicrobiana [recurso eletrônico] / Patricia Alejandra Mendoza Ortiz . – 2020.
1 recurso online (xvi, 99 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Adriano Aguiar Mendes.
Coorientadora: Érika Cristina Cren.

Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices: f. 97-99.

Inclui bibliografia.
Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia química - Teses. 2. Adsorção - Teses. 3. Lipase - Teses. 4. Sílica - Teses. 5. Otimização - Teses. 6. Antimicrobianos - Teses. I. Mendes, Adriano Aguiar. II. Cren, Érika Cristina. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.
CDU: 66.0(043)

Ficha catalográfica: Biblioteca Profº Mário Werneck, Escola de Engenharia da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

"SÍNTESE ENZIMÁTICA DE UM BIOSSURFACTANTE POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO – OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA"

Patricia Alejandra Mendoza Ortiz

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos à obtenção do título de **MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA**.

268ª DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19 DE FEVEREIRO DE 2020 POR:

.....
Prof. Dr. Manuel Noel Paul Georges Houmard
DEMC/UFMG

.....
Profa. Dra. Kátia Cecília de Souza Figueiredo
DEQ/UFMG

.....
Profa. Dra. Érika Cristina Cren
Coorientadora - DEQ/UFMG

.....
Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Orientador - Unifal-MG

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente porque Ele sempre me demostrou seu amor e sua presença em cada dia e me proporcionou as ferramentas para poder ter chegado até aqui.

Aos meus pais, Gerardo e Patricia, e meu irmão Gerardo, que são minha mais grande base, minhas avós e minha família, por me apoiarem ainda na distância, e demostrarem seu amor e orgulho. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, me motivando e apoiando.

Aos meus avós e meu amigo Edsel, por me guiarem desde o céu, e me deram forças para continuar. Obrigada por ser meus anjos e minha luz.

A meu país: México, que me deu as ferramentas para eu poder vivenciar um mestrado no estrangeiro e me formou como profissional. Estou orgulhosa de ser mexicana.

Ao Gustavo pela confiança, apoio e amor demostrado ao longo deste processo, ainda na distância. Obrigada por saber estar presente cada dia e pela paciência.

Aos meus amigos Victoria, Esteban, Julian, Pilar, Marcel, Alix, Rafael, Eduard, Gabi, Ezequiel e Jesus, ao time de basquete do Grifo e do *crossfit* da Tório pela amizade, ajuda, companhia, bons momentos que compartilhamos e o carinho demostrado no dia a dia. Obrigada pelas conversas e por fazer destes dois anos uma experiencia inesquecível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, sem qual nada disso seria possível, pela confiança, orientação e dedicação no desenvolvimento deste trabalho e pelo carinho de sempre. Obrigada por ter me orientado tanto no mestrado, como fora do laboratório. Obrigada por compartilhar comigo todas as suas experiencias, conhecimentos e virtudes, e por toda paciência que você teve comigo. Nunca esquecerei você e levarei comigo tudo o que nós compartilhamos.

À minha coorientadora Profa. Dra. Érika Cristina Crén, pela ajuda e dedicação durante a realização deste trabalho e por também compartilhar comigo seus conhecimentos, por todas as suas orientações e por todas as experiencias que marcaram meu mestrado positivamente.

À Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz e ao pesquisador Omar Cabezas Gómez, pela ajuda e colaboração na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Universidade Federal de Alfenas, pela infraestrutura fornecida e apoio que concedem aos seus alunos de pós-graduação, sempre incentivando e auxiliando no desenvolvimento dos projetos e aprendizado.

Gostaria de agradecer também ao pessoal do Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL e da UFMG, pelo auxilio e acolhimento, vocês foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

As minhas colegas de estudos, Iara Bolina e Rafaela Santos, por todas as horas de trabalho juntas no laboratório e por me auxiliar na conclusão de vários ensaios.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química da UFMG, pelos ensinamentos compartilhados e esclarecimentos de dúvidas. Principalmente às Profas. Dra. Kátia Figueiredo e Dra. Andrea Oliveira, pela cooperação, dicas e comentários realizados na minha qualificação.

À secretaria de pós-graduação, Fernanda Moura de Abreu, por todo apoio, presteza, ajuda, simpatia e esclarecimentos durante todo esse tempo.

Ao Programa de Bolsas da OEA pela oportunidade de realizar meu mestrado no Brasil.

Ao Concelho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa e à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Dedico esta dissertação a Deus, meus pais Gerardo e Patricia e meu irmão Gerardo que me apoiaram, incentivaram e ajudaram ainda na distância. Sem seu apoio e amor tudo teria sido muito mais difícil. A conquista é nossa.

RESUMO

O presente projeto de mestrado consistiu na preparação de biocatalisadores heterogêneos por ativação interfacial de três lipases diferentes – *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida rugosa* tipo VII (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF), utilizando partículas de sílica obtidas por processo hidrotérmico da casca de arroz e funcionalizada com trietoxi(octil)silano – OCTES (Octil-SiO_2). Os parâmetros de imobilização foram determinados na hidrólise da emulsão de azeite de oliva e concentração de proteína adsorvida. Os biocatalisadores preparados foram empregados na esterificação de ácido palmítico e DL-Isopropilidenoglicerol (Solketal) em meio orgânico para a síntese de palmitato de solketila, um éster com propriedades emulsificantes. De acordo com os resultados, máximo carregamento de proteína imobilizada de 20–22 mg/g de suporte foi obtido, independentemente da fonte de lipase. LTL–Octil–SiO_2 foi o biocatalisador mais ativo na hidrólise do azeite de oliva emulsificado (656 ± 24 U/g) e na síntese do éster (produtividade de 7 mmol/min.g_{biocat}), consequentemente selecionado para estudos de otimização. O efeito de alguns importantes parâmetros como concentração de biocatalisador, temperatura de reação e razão molar ácido:álcool na reação foi avaliado por um delineamento composto central rotacional (DCCR), mantendo-se fixa a agitação mecânica (240 rpm) e o tempo de reação (15 min). Em seguida, foi também avaliado o efeito da concentração de reagentes e de peneira molecular. Nas condições ótimas de reação (56°C, ausência de peneira molecular, razão molar ácido:álcool de 1:3 com concentração inicial de ácido palmítico de 1 mol/L e 800 U de atividade de enzima, que corresponde a 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação), máxima conversão de 83% foi obtida após 150 min de reação. O biocatalisador foi estável, retendo 87% de sua atividade inicial após 7 bateladas sucessivas de reação. O produto (palmitato de solketila) foi identificado por ressonância magnética nuclear (RMN). Estudos de atividade antimicrobiana mostraram que o éster sintetizado apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, com uma concentração inibitória mínima (CIM) entre 200 e 400 µg/mL, e ação bacteriostática/fungistática – concentração microbicida mínima (CMM) >400 µg/mL.

Palavras-chave: Adsorção de lipase; Sílica de casca de arroz; Síntese de biossurfactante; Otimização; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The present study aimed the preparation of heterogeneous biocatalysts by interfacial activation of three different lipases – *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Candida rugosa* type VII (CRL), and *Pseudomonas fluorescens* (PFL), using rice husk silica functionalized with triethoxy(octyl)silane (Octyl–SiO_2). Immobilization parameters were determined in the hydrolysis of olive oil emulsion and concentration of adsorbed protein. The prepared biocatalysts were used in the esterification of palmitic acid and DL-Isopropylidenoglycerol (Solketal) in organic medium for the synthesis of solketila palmitate, an ester with emulsifying properties. According to the results, maximum immobilized protein loading of 20–22 mg of lipase/g of support was obtained, independently of the lipase source. TLL–Octyl–SiO_2 was the most active biocatalyst in oil hydrolysis (656 ± 24 U/g) and ester synthesis (productivity of 7 mmol/min.g_{biocat}), and it has been chosen for further ester optimization. The effect of some important parameters such as biocatalyst concentration, reaction temperature and acid:alcohol molar ratio on ester synthesis was evaluated using a Central Composite Rotatable Design (CCRD), keeping mechanical stirring (240 rpm) and reaction time (15 min) fixed. Subsequently, the effect of reactants concentration and molecular sieve concentration was also examined. Under optimal reaction conditions (56°C, absence of molecular sieve, acid:alcohol molar ratio of 1:3 with initial palmitic acid concentration of 1 mol/L and 800 units of hydrolytic activity (U), that corresponds to 20% wt. of TLL–Octyl–SiO_2 per volume of reaction mixture), maximum acid conversion of 83% was obtained after 150 min of reaction. The biocatalyst was highly stable, retaining 87% of its initial activity after seven successive reaction batches. The product (solketila palmitate) was identified by nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. Antimicrobial activity studies showed that the synthesized ester demonstrated antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) between 200 and 400 µg/mL, and bacteriostatic/fungistatic action – minimum microbicidal concentration (MMC) >400 µg/mL.

Keywords: Lipase adsorption, rice husk silica; Biosurfactant synthesis; Optimization; Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese de monoglicerídeos por esterificação de ácidos graxos.....26
Figura 2 – Síntese de monoglicerídeos por transesterificação de triglicerídeos.....26
Figura 3 – Protocolos para imobilização de enzimas. 35
Figura 4 – Diagrama representativo da imobilização de lipases via ativação de interação em suportes hidrofóbicos.....36
Figura 5 – Características intrínsecas do suporte e da enzima que influenciam nas propriedades globais do biocatalisador. 38
Figura 6 – Esquema representativo da obtenção da sílica de casca de arroz.....45
Figura 7 – Esquema representativo da preparação e determinação dos parâmetros dos biocatalisadores. 46
Figura 8 – Reação de esterificação do ácido palmítico com solketal utilizando os biocatalisadores 48
Figura 9 – Reação de esterificação do ácido palmítico com solketal utilizando os biocatalisadores 49
Figura 10 – Esquema representativo da funcionalização da sílica obtida da casca do arroz com OCTES e a adsorção física das lipases no suporte preparado. 54
Figura 11 – Efeito da fonte de lipase na síntese de palmitato de solketila.....57
Figura 12 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados da variável resposta.....60
Figura 13 – Superfícies de reposta de acordo com o modelo quadrático predito para a síntese enzimática de palmitato de solketila. Efeito da temperatura e concentração do biocatalisador (A), efeito da razão molar ácido:álcool e concentração do biocatalisador (B) e efeito da razão molar ácido:álcool e temperatura (C) na porcentagem de conversão em éster. 64
Figura 14 – Gráficos de contorno obtidos de acordo com o modelo quadrático predito para a síntese enzimática de palmitato de solketila. Efeito da temperatura e concentração do biocatalisador (A), efeito da razão molar ácido:álcool e concentração do biocatalisador (B) e efeito da razão molar ácido:álcool e temperatura (C) na porcentagem de conversão em éster. 65
Figura 15 – Efeito da concentração de peneira molecular na síntese de palmitato de solketila 68
Figura 16 - Efeito da concentração de reagentes na síntese de palmitato de solketila.....69
Figura 17 -Testes de reúso do biocatalisador após sucessivos ciclos de reação de síntese de palmitato de solketila.....71

Figura 18 – (A) – CCD dos reagentes: solketal (A), ácido palmítico (Ac), e das frações sólidas (E1) e líquida (E2) do produto obtido. (B) – CCD das frações obtidas da separação por cartucho de sílica. Na faixa de frações 8-12 foi separado o éster e na faixa 13-21 é observado o solketal remanescente 73
Figura 19 – Estrutura do éster purificado – Palmitato de solketila 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revisão da literatura para a aplicação de lipases na síntese de monoglicerídeos por esterificação 29
Tabela 2 – Levantamento bibliográfico de suportes empregados para a imobilização de lipases por distintos métodos. 39
Tabela 3 – Características estruturais das preparações de lipases utilizadas neste estudo 55
Tabela 4 – Propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados via ativação interfacial das lipases em partículas de Octil-SiO_2 55
Tabela 5 – Conversão máxima e produtividade na reação de esterificação utilizando os distintos biocatalisadores 58
Tabela 6 – Matriz do delineamento experimental para a análise da influência das variáveis independentes na síntese enzimática de palmitato de solketila por esterificação direta utilizando LTL imobilizada em Octil-SiO_2 como biocatalisador. As reações foram conduzidas em meio heptano (6 mL de mistura reacional com concentração fixa de ácido palmítico – 200 mmol L^{-1}) por 15 min de reação em agitação constante (240 rpm). 59
Tabela 7 – Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de *p* para os parâmetros significativos na síntese enzimática de palmitato de solketila. 61
Tabela 8 – Analise de variância (ANOVA) 62
Tabela 9 – Testes de esterificação nas melhores condições reacionais baseadas na análise de superfície de resposta 66
Tabela 10 – Deslocamento químico e atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C e ^{1}H do palmitato de solketila. 75
Tabela 11 – Atividade antibiótica do éster – palmitato de solketila – contra fungos e bactérias. 76

LISTA DE SIGLAS

AGL – Ácidos graxos livres

AH – Atividade Hidrolítica

AE – Atividade específica

BS – Biossurfactante

BSA – Albumina de soro bovina

CCD – Cromatográfica de Camada Delgada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLEAs – Agregados de enzimas reticuladas

CMM – Concentração microbicida mínima

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DCCR – Delineamento composto central rotacional

DG – Diglicerídeos

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Cultura

GRAS – Geralmente Reconhecidos como Seguros

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

LCR – Lipase de *Candida rugosa*

LPF – Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

LTL – Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

LTL-Octil-SiO_2 – Biocatalisador da LTL

MG – Monoglicerídeos

MHA – Agar Müller-Hinton

OCTES – Trietóxi(octil)silano

Octil-SiO_2 – Sílica de casca de arroz funcionalizada com grupos octil

PC – Ponto central

PI – Proteína imobilizada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RSM – Metodologia de superfície de resposta

SiO_2 – Sílica ou Dióxido de silício

SDA - Agar Sabouraud

TG – Triglicerídeos

APRESENTAÇÃO

Este projeto de mestrado aborda a preparação e caracterização de um suporte hidrofóbico obtido a partir de sílica de casca de arroz funcionalizado, utilizado na elaboração de biocatalisadores, empregando a adsorção física de lipases por ativação interfacial. Os biocatalisadores foram aplicados na síntese de palmitato de solketila, com propriedade surfactante, por esterificação enzimática.

O texto apresentado neste documento está dividido em três partes, além da introdução, conclusão e dos anexos.

Na Introdução, é reportada a motivação e a proposta do projeto, especificando o preparo de biocatalisadores heterogêneos a partir da imobilização, por adsorção física, de lipases em sílica de casca de arroz funcionalizada, assim como sua aplicação na síntese de um éster com propriedades biossurfactantes, além dos objetivos gerais e específicos do trabalho desenvolvido.

A primeira parte traz uma Revisão da Literatura, abordando temas como biossurfactantes, especificamente monoglicerídeos, as vias de produção dos mesmos (convencional e esterificação enzimática), lipases, imobilização de enzimas por adsorção hidrofóbica e a importância da escolha adequada do suporte de imobilização, enfatizando o uso de sílica obtida da casca de arroz e sua funcionalização para melhorar o desempenho dos biocatalisadores heterogêneos. Desta forma, esse item embasa a pesquisa, as discussões e as considerações abordadas no trabalho.

Na segunda parte, apresentam-se as metodologias que foram utilizadas durante a condução deste projeto de mestrado.

A terceira parte do texto contém os resultados obtidos e as discussões desenvolvidas ao longo da fase experimental deste projeto.

Assim mesmo, são apresentadas as conclusões finais obtidas na elaboração deste projeto, além das sugestões e recomendações para trabalhos futuros.

Por fim, no Apêndice I são apresentados os trabalhos elaborados com os resultados adicionais e parciais obtidos no projeto e que foram divulgados nos seguintes eventos científicos: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos realizado entre os dias 28 a 31/07/2019 na cidade de Uberlândia, MG; II Workshop de Tecnologias Limpas que ocorreu os dias 19 e 20/09/2019 em Belo Horizonte, MG; e no *1st Congress on Science, Biodiversity and Sustainability* realizado nos dias 21 e 22/10/2019 em Belo Horizonte, MG, no qual o trabalho apresentado foi reconhecido como um dos melhores pôsteres apresentados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. OBJETIVO 21
2.1 OBJETIVO GERAL 21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23
3.1 BIOSSURFACTANTES 23
3.1.1 Monoglicerídeos: Ésteres de ácidos graxos. 24
3.2 ROTAS PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES 25
3.2.1 Obtenção de monoglicerídeos via catálise química 27
3.2.2 Obtenção de monoglicerídeos por esterificação enzimática 28
3.3 LIPASES 32
3.4 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES 34
3.4.1 Imobilização de lipases por adsorção física 35
3.5 SUPORTES PARA A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA 37
3.5.1 Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de suportes a base de sílica 40
3.5.2 Sílica de casca de arroz como suporte 41
4. MATERIAIS E MÉTODOS 44
4.1 MATERIAIS 44
4.2 PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA VIA PROCESSO HIDROTÉRMICO 44
4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA COM OCTES 45
4.4 PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES VIA ADSORÇÃO HIDROFÓBICA 45
4.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO 46
4.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DO PALMITATO DE SOLKETILA 48
4.7 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE REAÇÃO 49
4.7.1 Efeito da fonte de lipase na síntese do éster 49
4.7.2 Otimização dos parâmetros por delineamento composto central rotacional (DCCR) 50
4.7.3 Efeito da concentração da peneira molecular na síntese do éster 50
4.7.4 Efeito da concentração inicial dos reagentes 51
4.8 TESTES DE REÚSO DO BIOCATALISADOR 51

4.9 PURIFICAÇÃO DO ÉSTER 52
4.10 CARACTERIZAÇÃO DO ESTER – PALMITATO DE SOLKETILA 52
4.10.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)..... 52
4.10.2 Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica. Testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) 53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
5.1 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES CATALÍTICAS DOS BIOCATALISADORES NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE..... 55
5.2 SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIOSSURFACTANTE POR ESTERIFICAÇÃO..... 56
5.3 EFEITO DA FONTE DE LIPASE NA SÍNTESE DE ÉSTER 57
5.4 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA SÍNTESE DE ÉSTER – DCCR..... 58
5.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA PENEIRA MOLECULAR NA SÍNTESE 67
5.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE REAGENTES NA SÍNTESE DO ÉSTER..... 68
5.7 EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO NA SÍNTESE DO ÉSTER 70
5.8 TESTES DE REÚSO DO BIOCATALISADOR..... 71
5.9 LEVANTAMENTO DA LITERATRURA E COMPARAÇÃO COM O PRESENTE ESTUDO 72
5.10 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÉSTER..... 73
5.11 CARACTERIZAÇÃO DO ÉSTER PRODUZIDO..... 74
5.11.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) - Éster 74
5.11.2 Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica – CIM e CMM..... 76
6. CONCLUSÃO..... 77
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79
APÊNDICE I..... 97

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes (BS) são compostos que têm se mostrado uma alternativa promissora na substituição dos surfactantes químicos, derivados de combustíveis fósseis, devido às suas propriedades tensoativas, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade (ARAUJO et al., 2019; DONG et al., 2019). Dentre os diferentes biossurfactantes, ésteres derivados de ácidos graxos e glicerol, também conhecidos como monoglicerídeos, têm sido amplamente estudados por serem abundantemente produzidos e utilizados em escala industrial (HANDAYANI et al., 2018). Os monoglicerídeos (MG) são emulsificantes com maior aplicação nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (BUCHORI et al., 2019; KAPOOR; GUPTA, 2012; CETINA; GIRALDO; ORREGO, 2011). Estes biossurfactantes são geralmente reconhecidos como seguros – *status* GRAS (FREITAS et al., 2010; MO et al., 2019; ZHAO et al., 2011). Além das suas propriedades emulsionantes, recentemente o efeito antimicrobiano dos MG tem sido extensivamente estudado, pois inativam diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como fungos, leveduras e vírus envelopados (KYEONG YOON et al., 2018).

Na indústria, estes compostos são comumente sintetizados quimicamente via esterificação de ácidos graxos ou pela transesterificação de triglicerídeos com glicerol, utilizando catalisadores inorgânicos não seletivos (ácidos ou básicos) e elevadas temperaturas de reação (200-250°C) (GUMEL et al., 2011; KAPOOR; GUPTA, 2012). Porém, a rota química apresenta importantes desvantagens como baixo rendimento, dificuldade em obter compostos puros, alto consumo de energia e produtos com cor e sabor indesejáveis devido ao uso de condições extremas de temperatura que podem levar à decomposição térmica (ZHAO et al., 2011). Com o intuito de solucionar tais limitações, a substituição de catalisadores químicos inorgânicos por biocatalisadores – lipases, é uma alternativa promissora na síntese de ésteres devido à crescente demanda por produtos ambientalmente sustentáveis, além das vantagens do uso de temperaturas de reação menores, como menor consumo de energia e formação de produtos mais puros (KAEWTHONG et al., 2005; ZHAO et al., 2011).

Lipases (triacilglicerol éster acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas classificadas como hidrolases que atuam nas ligações éster carboxílicas. Estas enzimas têm a capacidade de catalisar diferentes reações químicas tanto em meio aquoso – hidrólise de ésteres, como em meio não aquoso – esterificação, interesterificação e transesterificação (GHOLAMZADEH; ZIARANI; BADIEI, 2017; VESCOVI et al., 2016). Devido a isso, estas enzimas têm sido amplamente utilizadas na produção de importantes ésteres aplicados em diversos setores

industriais, como alimentício (ésteres aromáticos, lipídios estruturados, maturação de queijos e produção de emulsificantes), farmacêutico, oleoquímico (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biolubrificantes e aditivos), agroquímico (síntese de inseticidas e pesticidas), formulação de detergentes, no tratamento de efluentes (redução de teor de lipídios de águas residuais), na química fina, obtenção de ceras e de biocombustíveis (biodiesel) (ADLERCREUTZ, 2013; AKACHA; GARGOOURI, 2015; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

No entanto, a aplicação de lipases em processos de grande escala, nas formas solúvel (líquidas) ou agregada (formulações em pó), é muitas vezes limitada devido ao seu elevado custo, sensibilidade a altas temperaturas, pH e meios orgânicos e à sua difícil separação do meio de reação, limitando a sua recuperação e reutilização ao final do processo (ADLERCREUTZ, 2013; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; HOMAEI et al., 2013). Com a finalidade de superar essas desvantagens, diferentes protocolos de imobilização de enzimas, químicos e físicos, como encapsulação, confinamento, adsorção física, ligação covalente em suportes ativados, processos híbridos e enzimas reticuladas (CLEA – agregado enzimático reticulado), têm sido empregadas na preparação de biocatalisadores heterogêneos (ADLERCREUTZ, 2013; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; HOMAEI et al., 2013).

Em relação às lipases, o protocolo de imobilização preferido é a adsorção física em suportes hidrofóbicos, devido a sua simplicidade, baixo custo, facilidade de operação, exigência de condições operacionais brandas, fácil regeneração do suporte por dessorção de moléculas de enzima inativas empregando diferentes agentes químicos e melhoramento na estabilidade térmica e atividade catalítica das lipases em meios não-aquosos (ALVES et al., 2017, BOLINA et al., 2018; FACIN et al., 2019).

A fim de obter biocatalisadores heterogêneos com alta atividade catalítica e limitações mínimas de difusão das moléculas do reagente/produto, a seleção do suporte desempenha um papel decisivo no processo de imobilização enzimática (ALVES et al., 2017; VESCOVI et al., 2016). Uma ampla gama de suportes, orgânicos e inorgânicos, têm se mostrado promissores na preparação de biocatalisadores heterogêneos via adsorção física. Entre eles, materiais cerâmicos como sílica, óxido de alumínio, dióxido de titânio e partículas magnéticas (BOLINA et al., 2018; KUMAR et al., 2013; MULEY; CHAUDHARI; SINGHAL, 2017) têm sido amplamente empregados devido a suas propriedades como grande área de superfície, tamanho uniforme dos poros, fácil funcionalização com uma extensa variedade de compostos (como agentes silanos ou líquidos iônicos) com o intuito de melhorara a sua capacidade de retenção de enzimas, resistência ao ataque microbiano, alta estabilidade mecânica e térmica e baixa

toxicidade que permitem aplicá-los em uma vasta faixa de condições experimentais (GHOLAMZADEH; ZIARANI; BADIEI, 2017; HOMAEI et al., 2013; ZUCCA; SANJUST, 2014).

Materiais à base de sílica (SiO_2) têm sido os suportes inorgânicos preferidos na preparação de biocatalisadores via adsorção física devido às suas propriedades superficiais, alta estabilidade e baixa toxicidade (DORCHEH; ABBASI, 2008). Além disso, a superfície deste suporte pode ser facilmente modificada por diferentes grupos funcionais para melhorar a sua capacidade de retenção de enzimas, resultando em biocatalisadores mais estáveis, resistentes e versáteis (HOMEI et al., 2013). Partículas de sílica são comercializadas por distintas empresas internacionais, mas também, podem ser produzidas a partir da técnica sol-gel empregando diferentes precursores silanos, ou bem, por processos termoquímicos a partir de subprodutos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, folhas de bambu, cascas de amendoim, dentre outros (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; LIMA, et al., 2015; VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015; VESCOVI, et al., 2016).

A sílica obtida da casca de arroz, em virtude do seu baixo custo, características físico-químicas interessantes e fácil obtenção, tem sido aplicada em diversos setores como aditivo para a produção de cimento e argamassas, produção de adsorventes para corantes, na remoção de poluentes de resíduos industriais (CO_2 e íons) e na produção de baterias e supercapacitores (CUI et al., 2017; LIU et al., 2015; MOR; CHHODEN; RAVINDRA, 2016; MURARO; OLIVEIRA; DENIS, 2018).

No nosso grupo de estudo, diversos trabalhos de pesquisa já têm sido desenvolvidos para o estudo da imobilização de distintas lipases em diferentes suportes. A imobilização por adsorção física da enzima LTL tem sido amplamente estudada em vários materiais. Entre eles, as investigações realizadas por Machado et al. (2019) e Miguez et al. (2018) demostraram que a utilização da sílica de casca de arroz funcionalizada com diferentes grupos, cria um ambiente propício para a imobilização da lipase (LTL) por distintos métodos, entre eles a adsorção física via interações iônicas e hidrofóbicas (MACHADO et al., 2019; MIGUEZ et al., 2018).

Contextualizando o emprego de suportes hidrofóbicos na imobilização de lipases, Machado et al. (2019) utilizaram OCTES na funcionalização de sílica de casca de arroz e imobilizaram LTL, resultando em um biocatalisador ativo na síntese de um éster cosmético, e estável após 6 ciclos sucessivos de reação. A fim de estudar a imobilização de outras lipases neste suporte hidrofóbico, o presente trabalho procura demonstrar a versatilidade do suporte derivado (Octil-SiO_2), assim como a viabilidade de empregar e reutilizar os biocatalisadores preparados na síntese de um éster de interesse industrial (MACHADO et al., 2019).

Neste sentido, o objetivo desta proposta de mestrado é a preparação e caracterização de biocatalisadores heterogêneos mediante a imobilização por adsorção física via interações hidrofóbicas de três lipases comerciais de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) usando como suporte Octil-SiO_2 (MACHADO et al., 2019). Os biocatalisadores derivados foram empregados na síntese de um biossurfactante por reação de esterificação de ácido palmítico e DL-Isopropilidenoglicerol (solketal) em meio orgânico. O biocatalisador com maior produtividade na reação de esterificação, foi selecionado para estudo de otimização de parâmetros de processo empregando-se a metodologia estatística de superfície de resposta (RSM) em um planejamento de experimentos Composto Central Rotacional (DCCR). Uma vez selecionadas as condições ótimas de reação, testes de reúso do biocatalisador após sucessivos ciclos de reação foram realizados.

A preparação e utilização destes biocatalisadores na síntese de palmitato de solketila por reação de esterificação não têm sido reportadas na literatura, o que demonstra a inovação da presente proposta.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto de mestrado consiste na preparação e caracterização de biocatalisadores heterogêneos a partir da imobilização de diferentes lipases – *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) por adsorção física, em partículas hidrofóbicas obtidas da funcionalização da sílica de casca de arroz. Os biocatalisadores foram aplicados na síntese de palmitato de solketila por reação de esterificação em meio orgânico. O objetivo geral do projeto foi alcançado pela execução dos objetivos específicos descritos na seção a seguir.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a preparação de partículas de sílica via tratamento hidrotérmico a partir de casca de arroz, e subsequente funcionalização com trietóxi(octil)silano (OCTES);
- Avaliar a imobilização de diferentes lipases (LTL, LCR e LPF) em Octil-SiO_2, mediante a determinação da concentração de proteína imobilizada e atividade catalítica dos biocatalisadores preparados, a partir da reação de hidrólise da emulsão de azeite de oliva;
- Analisar a atividade catalítica dos biocatalisadores heterogêneos preparados, mediante sua aplicação na síntese de palmitato de solketila por esterificação em meio orgânico. Selecionar o biocatalisador com a maior produtividade na reação;
- Estudar a otimização dos parâmetros operacionais de reação, mediante a metodologia de superfície de resposta aplicada a um planejamento experimental composto central. Os fatores avaliados são: a temperatura de reação (28 – 60°C), a concentração de biocatalisador (100 – 1500 U) e a razão molar ácido:álcool (1:1 – 1:5);
- Avaliar o efeito individual dos parâmetros: concentração de peneira molecular (0 – 20%), concentração inicial de reagentes variando de 0,2 M a 1 M para o ácido palmítico, mantendo-se fixa a razão molar ácido:álcool de 1:3 e tempo de reação.
- Comprovar a estabilidade do biocatalisador mediante testes de reúso em ciclos de reações sucessivas nas condições operacionais ótimas determinadas;

- Caracterizar estruturalmente o éster obtido (palmitato de solketila) mediante a técnica de ressonância magnética nuclear;
- Avaliar a atividade biológica do palmitato de solketila em diferentes cepas de bactérias e fungos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são compostos de natureza anfipática que possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, o que lhes permite atuar como tensoativos nas interfaces entre componentes com diferentes polaridades e reduzir as tensões interfaciais e superficiais (SANTOS et al., 2016, 2017). Estes compostos químicos apresentam uma ampla faixa de aplicações industriais envolvendo emulsificação, detergência, lubrificação, umectação, formação de espuma e dispersão ou solubilização de diferentes fases (SILVA et al., 2014a). Convencionalmente, a maioria dos surfactantes são obtidos de fontes de combustíveis fósseis (petróleo) em condições de reação desfavoráveis, como alta temperatura, alta acidez ou alcalinidade, uso de solventes orgânicos, baixa biodegradabilidade e alta toxicidade aquática (REN; LAMSAL, 2017). Além disso, tais agentes tensoativos sintéticos são geralmente tóxicos e de difícil decomposição por microrganismos (SANTOS et al., 2017).

Neste sentido, os biossurfactantes (BS) têm se mostrado como uma alternativa promissora na substituição de surfactantes químicos, uma vez que podem ser obtidos por reações enzimáticas ou de fermentação microbiológica, a partir de matérias-primas biológicas renováveis, sendo compostos biodegradáveis (SANTOS et al., 2016). Dentre estes, os surfactantes de base biológica derivados de microrganismos podem ser classificados em fosfolipídios, glicolipídios, lipopeptídos, lipoproteínas, ácidos graxos, lipídios neutros e biossurfactantes poliméricos (ARAUJO et al., 2019; CAMERINI et al., 2019). Na síntese enzimática de biossurfactantes, as enzimas majoritariamente utilizadas são lipases, proteinases e glucosidases. As reações enzimáticas apresentam vantagens como maior seletividade, temperaturas de reação menores, menor toxicidade do solvente e fácil separação dos produtos em comparação com a síntese química tradicional (REN; LAMSAL, 2017).

Os BS apresentam diferentes vantagens com relação aos surfactantes químicos, pois possuem baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de exibir capacidade de emulsificação e atividade biológica antimicrobiana (DONG et al., 2019; HEMA et al., 2019). Portanto, estes aditivos de origem renovável apresentam potencial uso em diversas aplicações industriais, como aditivo alimentar e de bebidas, na indústria de petróleo, de cosméticos, têxteis, farmacêutica, na biorremediação e de detergentes (SANTOS et al., 2016).

3.1.1 Monoglicerídeos: Ésteres de ácidos graxos.

Os monoglicerídeos (MG), também conhecidos como ésteres de ácidos graxos e glicerol, são os emulsificantes com maior aplicação nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (BUCHORI et al., 2019; CETINA; GIRALDO; ORREGO, 2011; KAPOOR; GUPTA, 2012). Da mesma forma, devido às suas excelentes propriedades lubrificantes, espessantes e plastificantes, também são usados no processamento têxtil, produção de plásticos e formulação de óleos (HWANG et al., 2009). Os MG são biossurfactantes não-iônicos que podem ser sintetizados, a partir de matérias-primas de fontes renováveis (ácidos graxos e glicerol), por reação de esterificação. Estes ésteres possuem uma estrutura química anfipática onde os grupos hidroxila (-OH) livres do componente alcoólico (glicerol) representam a parte hidrofílica da molécula, enquanto a porção hidrocarboneto do ácido graxo conforma a região hidrofóbica (FERRETTI, 2010).

Os ésteres de glicerol e ácidos graxos são atrativos devido a sua alta disponibilidade, estabilidade química, biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de efeitos irritantes e tóxicos (DOLEZALOVA et al., 2010). Estes biossurfactantes possuem *status* GRAS (21CFR184.1505) – geralmente reconhecidos como seguros – pela FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos – *Food and Drug Administration*) o que contribui para seu grande emprego em nível industrial (DOLEZALOVA et al., 2010; FREITAS et al., 2010; MO et al., 2019; ZHAO et al., 2011).

Os MG são amplamente utilizados na indústria de alimentos como emulsificantes, pois facilitam a estabilização de emulsões em produtos como margarinas e molhos e controlam a textura de pães e sobremesas. Igualmente, são envolvidos na evolução da massa de padaria, no arejamento de bolos e sorvetes, e como umectante na preparação de alimentos instantâneos (FERRETTI, 2010). No segmento farmacêutico, eles são usados como núcleo de comprimidos e como emoliente para emplastos de absorção lenta, e previnem a precipitação e o envelhecimento dos outros compostos graxos na formulação (FERRETTI, 2010). Na área de cosméticos, são utilizados como agentes texturizantes em cremes e loções, melhorando sua consistência. Do mesmo modo, são usados como plastificantes na produção de filmes de celulose e como lubrificantes na síntese de polímeros, processos têxteis e na formulação de óleos (CETINA MEDINA, 2010).

Recentemente, o efeito antimicrobiano de uma variedade de lipídios, tais como ácidos graxos livres (AGL) e os MG de ácidos graxos tem sido extensivamente estudado. Em uma revisão realizada por Kyeong Yoon et al. (2018), observou-se que diversos AGL e seus MG

são agentes antimicrobianos promissores porque inativam diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como fungos, leveduras e vírus envelopados (KYEONG YOON et al., 2018).

A atividade antimicrobiana dos MG, assim como suas outras propriedades funcionais, depende do número de átomos de carbono e da presença de duplas ligações na cadeia do ácido graxo (grau de insaturação). Os ácidos graxos insaturados com cadeias médias e longas, assim como seus MG, apresentam uma maior eficácia antibacteriana. De acordo com diversos trabalhos, é possível afirmar que o processo de esterificação de ácidos graxos em MG aumenta sua atividade antimicrobiana (BUNKOVA et al., 2011; HANDAYANI et al., 2018; KYEONG YOON et al., 2018).

3.2 ROTAS PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES

Ésteres são importantes compostos químicos que atuam como intermediários na produção de plastificantes, tintas, combustíveis líquidos, aromas, medicamentos, cosméticos, lubrificantes e surfactantes (CHOWDHURY et al., 2014; VESCOVI et al., 2017, WANG et al., 2016). Dentro dos últimos, os MG, são ésteres que resultam da reação de glicerol e ácidos graxos de cadeia média ou longa com propriedades tensoativas interessantes (FREITAS et al., 2008). A produção industrial destes ésteres geralmente é realizada a partir de duas vias diretas que utilizam glicerol como reagente. A primeira é a esterificação de ácidos graxos e a segunda, a transesterificação de triglicerídeos (CETINA MEDINA, 2010; FERRETTI, 2010).

Na esterificação de ácidos graxos, uma molécula de glicerol reage com uma molécula de ácido graxo para produzir uma molécula de monoglicerídeo e uma molécula de água (FERRETTI, 2010). No entanto, juntamente a esta reação primária, duas reações secundárias ocorrem simultaneamente, como mostrado na Figura 1. Na primeira reação secundária, a concentração de MG é reduzida, devido a sua reação com o ácido graxo para obter diglicerídeos. Da mesma forma, por meio da segunda reação secundária, os diglicerídeos se combinam com o ácido graxo gerando triglicerídeos. Portanto, as reações paralelas na reação de esterificação de ácidos graxos ocasionam um menor rendimento em MG (CETINA MEDINA, 2010).

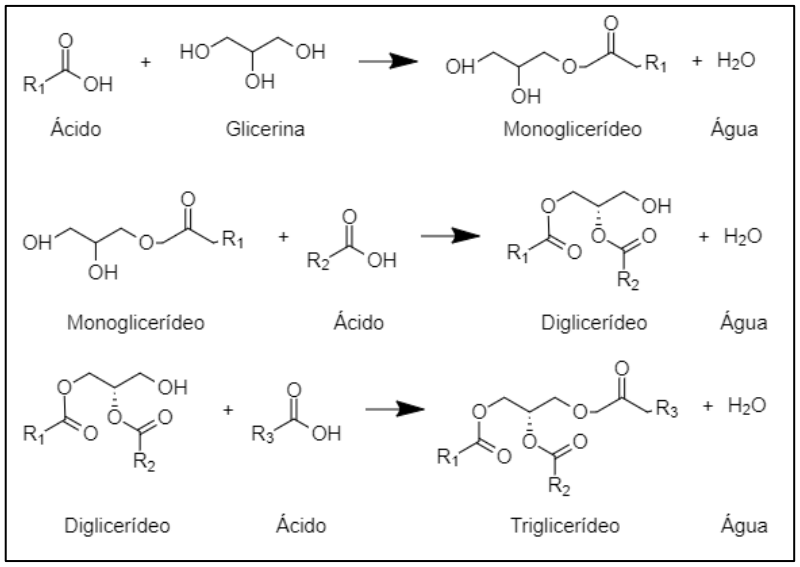


Figura 1 – Síntese de monoglicerídeos por esterificação de ácidos graxos
Fonte: Do autor

Contudo, na reação de transesterificação ou glicerólise de triglicerídeos, duas reações são desenvolvidas para a obtenção de MG, como mostrado na Figura 2. Na primeira, triglicerídeos (TG) e glicerina se combinam para produzir MG e diglicerídeos (DG). Subsequentemente, na segunda reação, DG e glicerina reagem para gerar duas moléculas de MG (CETINA MEDINA, 2010). Neste caso, três moléculas de MG são produzidas.

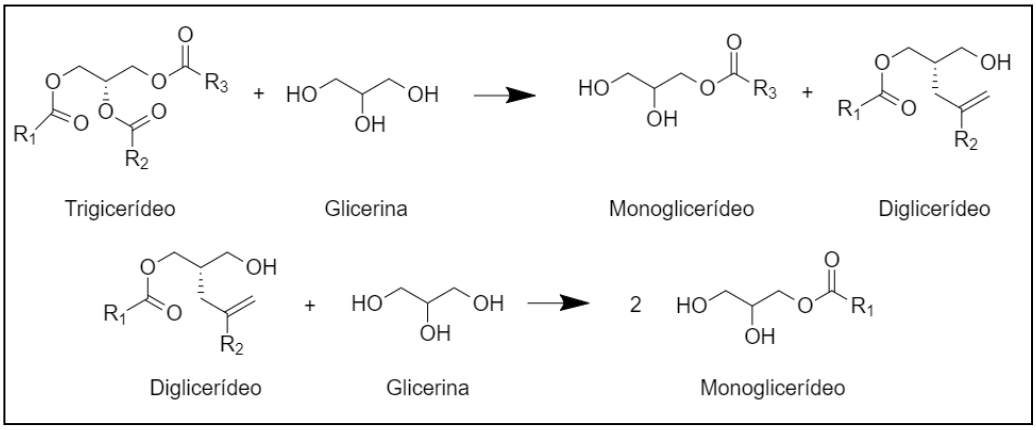


Figura 2 – Síntese de monoglicerídeos por transesterificação de triglicerídeos
Fonte: Do autor

Os ácidos graxos normalmente usados para produzir MG são preferencialmente aqueles de cadeia longa, compostos de oito ou mais átomos de carbono (FERRETTI, 2010). Algumas propriedades dos MG dependem do número de carbonos e do grau de saturação dos ácidos graxos implicados (KYEONG YOON et al., 2018). A obtenção de MG, a partir dessas duas reações principais, pode ser feita através da utilização de catalisadores químicos homogêneos ou heterogêneos, ou por via enzimática utilizando lipases livres ou imobilizadas.

3.2.1 Obtenção de monoglicerídeos via catálise química

As reações de esterificação e transesterificação são as rotas mais empregadas na produção de biossurfactantes, contudo, em baixas temperaturas estas reações demandam longo tempo reacional. Portanto, convencionalmente, os MG são produzidos industrialmente por síntese química, utilizando catalisadores inorgânicos não seletivos e elevadas temperaturas de reação (GUMEL et al., 2011; KAPOOR; GUPTA, 2012). Estes catalisadores químicos podem ser ácidos ou básicos e homogêneos ou heterogêneos. Na esterificação de ácidos graxos, os principais catalisadores químicos homogêneos utilizados são ácidos minerais e orgânicos fortes, tais como ácido sulfúrico, ácido fosfórico e ácido *p*-toluenossulfônico. O uso de catalisadores ácidos, além de gerar a degradação dos ácidos graxos por oxidação e dimerização, envolve a formação de resíduos ácidos implicando em necessidade de pós-tratamentos para adequado descarte dos efluentes gerados (GUMEL et al., 2011; NIMLOS et al., 2006).

Por outro lado, a síntese de monoglicerídeos por glicerólise é tradicionalmente catalisada pelo uso de bases líquidas fortes, como o hidróxido de sódio ou potássio (CARDONA et al., 2010; ZHAO et al, 2011).

Embora a produção de MG por catálise homogênea tenha sido amplamente utilizada, o crescente interesse na utilização de catalisadores heterogêneos é um importante passo para a aplicação da química verde, visto que a separação do catalisador heterogêneo é possível mediante processos simples para sua reutilização, além de reduzir a contaminação dos produtos e a geração de subprodutos. Portanto, o uso de catalisadores sólidos é apresentado como uma opção industrial viável para um processo mais limpo (FERRETTI, 2010). A literatura disponível referente à síntese de MG por catálise química heterogênea inclui o uso de catalisadores sólidos ácidos como zeólitas, catalisadores mesoporosos modificados com ácido sulfônico e sílicas funcionalizadas, bem como catalisadores heterogêneos básicos, incluindo Cs-Sepiolita, MgO, CeO_2, La_2O_3 e ZnO (BUCHORI et al., 2019; CETINA MEDINA, 2010).

Apesar da síntese de MG por catálise química heterogênea superar algumas desvantagens quando comparada com a síntese por catálise homogênea, ambos processos requerem altas temperaturas de reação, entre 200°C e 250°C, o que, além de acarretar um alto consumo de energia, ocasiona produtos com cor e sabor indesejáveis e baixos rendimentos de produção, com uma concentração final de MG entre 40 e 60% (ZHAO et al., 2011). Muitas vezes, processos de purificação, como destilação molecular a vácuo, são necessários para atingir concentrações de MG iguais ou superiores a 90%, gerando um maior gasto energético (CETINA; GIRALDO; ORREGO, 2011). A fim de superar esses inconvenientes, o uso de

biocatalisadores (lipases) na produção de MG tem sido proposto como uma alternativa aos catalisadores químicos tradicionais (HANDAYANI et al., 2018; KAPOOR; GUPTA, 2012).

3.2.2 Obtenção de monoglicerídeos por esterificação enzimática

Na era da química verde, a crescente busca e adequação dos processos produtivos para processos industriais ecologicamente corretos têm aumentado o interesse no desenvolvimento de catalisadores com alta estabilidade e que, ao mesmo tempo, sejam fáceis de recuperar e reutilizar (FACIN et al., 2019; HUSAIN, 2017; MULEY et al., 2018). As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores naturais, acelerando a velocidade de reação de muitas reações químicas e bioquímicas, sem alterar o seu equilíbrio. Estas são utilizadas na biotransformação de produtos de grande interesse industrial (HOMAEI et al., 2013). Dentre as aplicações, tem havido um crescente interesse no uso de diferentes rotas enzimáticas para a modificação de óleos e gorduras. Estas aplicações envolvem processos de reação de hidrólise, síntese, esterificação e interesterificação de lipídios por meio de lipases, sendo a síntese de ésteres um dos processos mais estudados devido a obtenção de produtos com grande valor comercial (CASTRO et al., 2004; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

Recentemente a síntese de ésteres com propriedades surfactantes, principalmente MG, catalisada por lipases tem sido amplamente estudada como alternativa ao processo convencional, devido, especialmente, à utilização de condições reacionais brandas que impactam em baixo consumo energético e a seletividade das lipases que, de forma integrada, resultam em produtos de melhor qualidade. Cabe ressaltar que do ponto de vista ambiental, o processo enzimático é tecnicamente limpo e seguro (FREITAS et al., 2008).

A esterificação de glicerol e ácidos graxos por catálise enzimática tem sido extensivamente estudada, preferencialmente conduzida em meio orgânico, mas também em sistemas isentos de solventes, como resumido na Tabela 1.

Tabela 1 – Revisão da literatura para a aplicação de lipases na síntese de monoglicerídeos por esterificação (continua).

Lipase	Suporte	Método de imobilização	Condições reacionais	Conversão (%)	MG	Ref.
Lipozyme: *Rhyzomucor miehei*	Dualite A565 (Resina aniônica macroporosa)	Adsorção física	1g de glicerol adsorvido em sílica-gel:ácido oleico 100 mM (total 20 ml) em mistura equivolumétrica de n-hexano/2M2B, 40°C, 400 mg de lipase imobilizada	96,4% total 94% MG+2,4% DG+0% TG	Monoleína	BELLOT et al., 2001
Staphylococcus simulans	Carbonato de cálcio ($CaCO_3$)	Adsorção física	Ácido oleico:glicerol (1:5), isento de solvente, teor inicial de água 5% m/m, 100 U, 37°C, 48h e 200 rpm.	71,68% MG	Monoleína	CHAMGUI et al., 2006
Lipozyme IM[20]	Comercial	Comercial	25 g de meio, glicerol: ácido láurico (3:1), sistema livre de solvente, 200 rpm, 45-60°C, 0,5 g de lipase imobilizada, 6h	94,4% total	Monolaurina	FREITAS et al., 2007
Candida antarctica B (CALB)	POS-PVA ativado com glutaraldeído	Adsorção física	25 g de meio, glicerol: ácido láurico (3:1), sistema livre de solvente, 200 rpm, 45-60°C, 0,5 g de lipase imobilizada, 6h	78,8% total 36% MG	Monolaurina	FREITAS et al., 2007
Penicillium camembertti	Epoxi SiO_2-PVA	Adsorção física	Glicerol:ácido palmítico (8:1), 40 g de meio, isento de solvente, 45-65°C, 200 rpm, 6 h, 5% p/p de biocatalisador (5U / g de substrato)	55,76% total 45,86% MG+6,39% DG+3,51% TG	Monopalmitina (Monoglicerídeo de ácido palmítico)	FREITAS et al., 2010
			Glicerol:ácido láurico (8:1), 40 g de meio, isento de solvente, 45-65°C, 200 rpm, 6 h, 5% p/p de biocatalisador (5U / g de substrato)	94,5% total 59,4% MG+26,7% DG+8,4% TG	Monolaurina	
Candida sp *99-125*	N.I.	N.I.	Glicerol:ácido oleico (6:1), isento de solvente, 50°C, 8h, 190 rpm, 5% de biocatalisador, atividade de água inicial do biocatalisador 10%, assistida por 0% de β-ciclodextrina	49,6% MG	Monoleína	ZHAO et al., 2011
			Glicerol:ácido oleico (5:1), isento de solvente, 40°C, 8h, 190 rpm, 10% de biocatalisador, atividade de água inicial do biocatalisador 10%, assistida por 1.5% de β-ciclodextrina.	81,4% total 28,1% MG + 53,3% DG	Monoleína	

Tabela 1 – Revisão da literatura para a aplicação de lipases na síntese de monoglicerídeos por esterificação (conclusão).

Candida sp 99-125	N.I.	N.I.	Glicerol:ácido oleico (6:1), isento de solvente, 50°C, 8h, 190 rpm, 5% de biocatalisador, atividade de água inicial do biocatalisador 10%, assistida por 0% de β-ciclodextrina	49,6% MG	Monoleína	
			Glicerol:ácido oleico (5:1), isento de solvente, 40°C, 8h, 190 rpm, 10% de biocatalisador, atividade de água inicial do biocatalisador 10%, assistida por 1.5% de β-ciclodextrina.	81,4% total 28,1% MG + 53,3% DG	Monoleína	
Candida antarctica B (CALB)	N.I.	CLEAs – Agregados de enzimas reticuladas	Glicerol: ácido palmítico (4:1), em acetona sob sistema de baixa condição de água, 1g biocatalisador, 50°C, 300 rpm, 24h, 1% de água	85,5% total 81% MG + 4,5% DG	Monopalmitina (Monoglicerídeo de ácido palmítico)	KAPOOR; GUPTA, 2012
		PCMCs – Microcristais reticulados de proteínas	Glicerol: ácido palmítico (4:1), em acetona sob sistema de baixa condição de água, 1g biocatalisador, 50°C, 300 rpm, 24h, 0,5% de água	86% total 82% MG + 4% DG		
		CLPMC – Microcristais revestidos com proteína reticulada	Glicerol:ácido palmítico (4:1) em acetona sob sistema de baixa condição de água, 1g biocatalisador, 24h, 50°C, 300 rpm, 1% de água	90,3% total 87% MG + 3,3% DG		
		N.I.	Glicerol: ácido palmítico (4:1), em sistema de acetona sob baixa condição de água, 300 rpm, 24h, 50°C, 50 µL de CALB	49,4% total 48% MG + 1,4% DG		
Candida rugosa	N.I.	N.I.	Glicerol: AGL de óleo de coco (4:1), n-hexano como solvente (1:1), 5% de biocatalisador da massa total de substrato, 200rpm, 37°C, 18h	55,4% MG	Ésteres de ácido graxo de óleo de coco e glicerol	HANDAYANI et al., 2018
			Glicerol:ácido decanóico (4:1), n-hexano como solvente (1:1), 5% de biocatalisador da massa total de substrato, 200 rpm, 37°C, 18h	78,5% MG	Monocaprina	

N.I. indica "não há informação"
Fonte: Do autor

A literatura especializada neste tema compreende inicialmente o trabalho de Bellot et al. (2001), que estudaram a síntese de MG pela lipase de *Rhyzomucor miehei* por esterificação direta entre glicerol e ácido oleico em diferentes solventes orgânicos, mostrando que um aumento na polaridade do solvente, utilizando misturas de n-hexano e 2-metil-2-butanol (2M2B), melhora drasticamente a seletividade na formação de MG (BELLOT et al., 2001).

Mais tarde, Freitas et al. (2007) estudaram a influência de fatores como a razão molar dos reagentes, a fonte da lipase e o tipo de agente na ativação do suporte na obtenção de MG de ácido láurico. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase comercial Lipozyme IM20, com conversão de 94%. O uso do biocatalisador obtido da lipase de *Candida antarctica B* (CALB) imobilizada em POS-PVA (polissiloxano-álcool polivinílico) ativado com glutaraldeído também apresentou resultados promissores com 78,8% de conversão formando 36% de monoglicerídeo de ácido láurico (FREITAS et al., 2007).

Em um estudo posterior, os mesmos autores investigaram a obtenção de monoglicerídeos a partir de glicerol e diferentes ácidos graxos, catalisada pela lipase *Penicillium camembertii* imobilizada em epóxi SiO_2-PVA. Esta reação foi realizada em um sistema livre de solvente. Altas taxas de conversão foram obtidas para todos os ácidos avaliados, no entanto, uma maior seletividade na formação de MG foi observada usando ácido palmítico (FREITAS et al., 2016).

Kapoor e Gupta (2012) estudaram a produção de MG de ácido decanóico a partir de esterificação catalisada pela enzima CALB na sua forma livre e agregada. Altos rendimentos de esterificação foram observados para os monocristais e agregados de CALB (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Um estudo recente realizado por Handayani et al. (2018) reportaram a produção de monoglicerídeos a partir da esterificação do ácido decanóico e ácidos graxos derivados do óleo de coco catalisada pela lipase da *Candida antarctica*. Um dos principais objetivos deste trabalho foi obter produtos com alta atividade antimicrobiana. Os autores concluíram que um maior rendimento de esterificação e melhor atividade antimicrobiana foram atingidos com os MG obtidos a partir da esterificação do ácido decanóico, devido à influência do tamanho das cadeias de carbono dos ácidos graxos avaliados.

Embora a aplicação de diferentes lipases na produção de monoglicerídeos, a partir de diferentes ácidos graxos, estar sendo extensivamente estudada, o emprego das enzimas propostas neste projeto para a síntese enzimática heterogênea de MG a partir do ácido palmítico ainda não se encontra relatado na literatura.

3.3 LIPASES

Lipases (triacilglicerol éster acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas classificadas como hidrolases que atuam nas ligações éster carboxílicas. Estas enzimas têm a capacidade de catalisar diferentes reações químicas tanto em meio aquoso – hidrólise de ésteres como em meio não aquoso – esterificação, interesterificação e transesterificação. (GHOLAMZADEH; ZIARANI; BADIEI, 2017; VESCOVI et al., 2016). Devido a isso, elas têm sido amplamente utilizadas na produção de importantes ésteres aplicados em diversos setores industriais, como alimentício, farmacológico, oleoquímica, agroquímico, na formulação de detergentes, na biorremediação ambiental e tratamento de efluentes, química fina, ceras e geração de biocombustíveis (ADLERCREUTZ, 2013; AKACHA; GARGOOURI, 2015; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

Estas enzimas são produzidas a partir de várias fontes animais e vegetais e de microrganismos como fungos e bactérias. A produção de lipases por microrganismos é a mais utilizada devido à sua simplicidade em termos de manipulação genética e condições de cultura (ADLERCREUTZ, 2013; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019). Além disso, a termoestabilidade das lipases varia consideravelmente dependendo de sua origem, sendo as de origem microbiana as que possuem maior estabilidade térmica. As lipases microbianas mais utilizadas são obtidas dos gêneros *Bacillus* sp., *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Pseudomonas* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp. e *Geotrichum* sp. (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

A maioria das lipases possui uma propriedade estrutural comum, com presença de uma "tampa" ou "*lid*" cujas mudanças conformacionais controlam o acesso das moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima. Essa tampa consiste em uma cadeia polipeptídica, que possui duas conformações em meio aquoso: (i) uma forma fechada, em que a tampa cobre o sítio ativo de maneira que a lipase se conserve inativa, e uma conformação aberta ou ativa, na presença de uma interface hidrofóbica, que pode ser uma gota de óleo ou bem qualquer outro suporte hidrofóbico, em que a tampa se move e o sítio ativo fica acessível às moléculas de substrato. Normalmente, essas duas conformações (aberta ou fechada) da lipase estão em equilíbrio diretamente afetado pelas condições ambientais do meio reacional (TAO et al., 2014).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) é uma enzima de natureza proteica constituída por uma cadeia de 269 aminoácidos, com massa molecular de 31,7 kDa, diâmetro molecular aproximado de 53,2 Å, pH ótimo em redor a 9, ponto isoelétrico de 4,4 e temperatura ótima entre 55 e 60°C (LAGE et al., 2016; MIRANDA et al., 2014). Esta lipase é uma enzima 1,3-específica, utilizada amplamente na modificação de óleos e gorduras, na síntese de distintos

ésteres de interesse industrial – alimentos, química fina, biocombustíveis, tratamento de aguas residuais, resolução de misturas racêmicas, dentre outras aplicações (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Por outro lado, a lipase produzida por *Candida rugosa* (LCR) é uma enzima não-específica (hidrolisa todas as ligações éster existentes em um triglicerídeo) formada por uma cadeia de 534 aminoácidos, massa molar aparente de aproximadamente 60 kDa, raio molecular de aproximadamente 34 Å, atividade ótima em pH entre 6,5 – 7,5, ponto isoelétrico de 4,5 e faixa de temperatura ótima entre 35 e 40°C (ALARCON, 2008; NEVES PETERSEN; FOJAN; PETERSEN, 2001). Esta enzima tem sido amplamente utilizada em reações de hidrólise e síntese importantes, como na produção de aromas, detergentes, produtos farmacêuticos, aminas e amidas, entre outros. Da mesma forma, tem sido imobilizada em diferentes suportes, formando biocatalisadores com resultados interessantes para a esterificação (BENJAMIN; PANDEY, 1998).

A lipase derivada da *Pseudomonas fluorescens* (LPF) é uma enzima 1,3-específica, que tem massa molecular aparente de 29 kDa, diâmetro molecular aproximado de 50 Å, faixa ótima de pH de 6,5 - 8,5, ponto isoelétrico entre 4,5 – 5,1 e temperatura ótima de 50 a 55°C (NEVES PETERSEN; FOJAN; PETERSEN, 2001; SZTAJER; BORKOWSKI; SOBIECH, 1991). Esta lipase também possui diferentes áreas de aplicação, porém tem sido utilizada principalmente na síntese de biodiesel e diferentes ésteres alquílicos por transesterificação de diferentes óleos vegetais (LIMA et al., 2015).

Por mais que o uso de lipases em processos industriais seja uma alternativa aos métodos convencionais não enzimáticos, a aplicabilidade em larga escala de enzimas livres, seja em sua forma solúvel ou em pó, é limitada devido a certas inconveniências associadas à parte operacional dos sistemas, o que resulta em altos custos de processo. Algumas dessas desvantagens são a difícil recuperação e reutilização da enzima, os altos custos de purificação dos produtos, sensibilidade a altas temperaturas e solventes orgânicos e a necessidade de processos drásticos de inativação, como altas temperaturas, uso de solventes orgânicos ou cisalhamento mecânico (ADLERCREUTZ, 2013; FACIN et al., 2019; HOMAEI et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015; ZHAO et al., 2015a). Neste contexto, vários processos para melhorar as características e aplicação destes biocatalisadores têm sido investigados e propostos, tais como imobilização de enzimas e modificação genética.

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Diferentes técnicas de imobilização de lipases têm sido desenvolvidas com o objetivo de superar as desvantagens apresentadas na utilização industrial de enzimas em sua forma livre. Estas técnicas são baseadas no confinamento da enzima em um suporte sólido, formando biocatalisadores heterogêneos que podem ser reutilizados posteriormente, tornando o processo menos oneroso (ADLERCREUTZ, 2013; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019). O desenvolvimento destes métodos de imobilização possibilita a reutilização de enzimas, facilitam a separação de produtos e aumentam a estabilidade dos biocatalisadores em solventes orgânicos. O principal interesse da imobilização é a obtenção de um biocatalisador com atividade catalítica e estabilidade operacional idealmente superior, que não são afetados durante os processos de reação e permitam sua reutilização (BARBOSA et al., 2014).

As principais vantagens operacionais obtidas pela imobilização enzimática são: o aumento da atividade enzimática, enantioseletividade, estabilidade térmica e resistência a mudanças do meio reacional do biocatalisador derivado, maior estabilidade estrutural da enzima reduzindo sua inativação, o uso de altas concentrações de enzima em reatores com maior controle de processo e fácil recuperação do meio de reação permitindo sua reutilização sem perdas significativas de sua atividade catalítica (BARBOSA et al., 2014; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013; ZHAO et al., 2015a). As possíveis desvantagens desse processo são: possíveis alterações na conformação natural da enzima, possibilidade de apresentar limitações de transferência de massa, perda de atividade durante o processo de imobilização e o elevado custo do suporte utilizado (ADLERCREUTZ, 2013).

Distintos protocolos têm sido empregados na imobilização de lipases, como indicado na Figura 3. Estes protocolos podem ser classificados de acordo ao tipo de ligação enzima-suporte como físicos ou químicos, tais como adsorção física em suportes hidrofóbicos ou iônicos (catiônicos e aniônicos), encapsulamento ou confinamento, ligação covalente e enzimas reticuladas – *crosslinked enzymes aggregates* (CLEAs) (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; GHOLAMZADEH; ZIARANI; BADIEI, 2017; VESCOVI et al., 2017). A seleção do método mais apropriado de imobilização, deve fundamentar-se em distintos critérios, tais como atividade catalítica do biocatalisador, estabilidade operacional, custo do protocolo de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização empregados e características gerais do suporte utilizado (MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013). Na presente proposta de projeto de mestrado, o método de adsorção física por ativação interfacial – em suporte hidrofóbico, foi utilizado na imobilização de LTL, LCR e LPF.

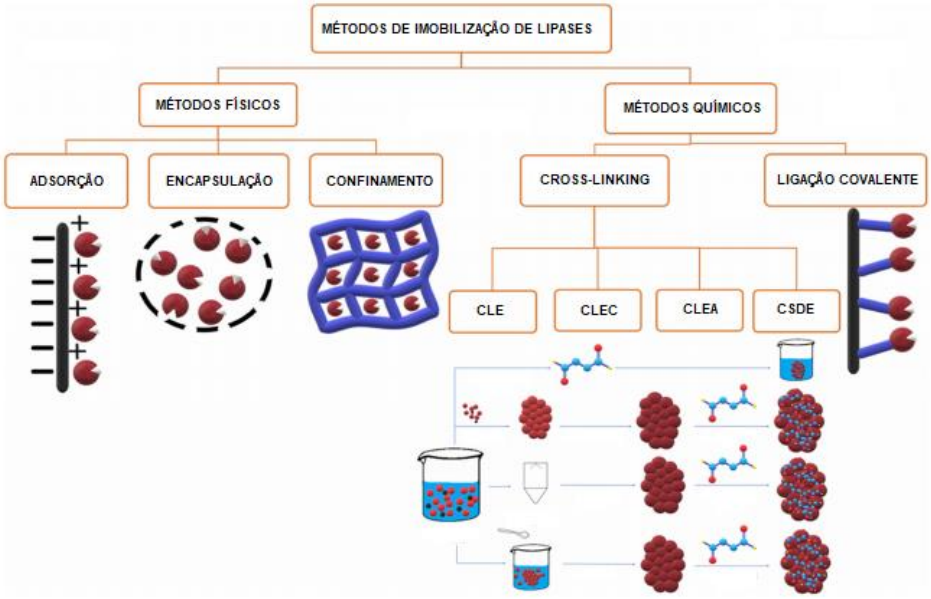


Figura 3 – Protocolos para imobilização de enzimas.
Adaptado de: (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019)

3.4.1 Imobilização de lipases por adsorção física

Como mencionado anteriormente (seção 3.3), uma propriedade estrutural particular de muitas lipases é a presença de uma "tampa" conhecida como "*lid*" que pode alterar a sua conformação, de tal modo que controla o acesso de moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima. Esta cobertura possui duas conformações em meio aquoso: uma forma fechada em que o subdomínio protege o sítio ativo de forma que a lipase permanece inativa e uma configuração aberta (ou ativa) em que o centro catalítico fica disponível às moléculas de substrato (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Esses rearranjos de conformação geralmente levam a adsorção da enzima na presença de uma interface hidrofóbica – mecanismo de ativação interfacial de lipases, segundo ilustrado pela Figura 4 (BASSI et al., 2016; FACIN et al., 2019). Dessa forma, a lipase é adsorvida na superfície do suporte, em sua forma aberta, ficando o sítio ativo exposto ao meio reacional (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

O protocolo mais popular na imobilização de lipases é a adsorção física (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; HOMAEI et al., 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Quando comparada com outras técnicas de imobilização, o processo de adsorção física é vantajoso nos seguintes aspectos: condições brandas e facilidade de operação, custos relativamente baixos dos suportes e do processo de imobilização, não são requeridos aditivos

químicos durante o processo, fácil regeneração para reutilização dos biocatalisadores por aplicação de agentes químicos que promovem a dessorção de enzimas e alta recuperação da atividade catalítica da lipase (CABRERA et al., 2009; PALOMO et al., 2002; ZHAO et al., 2015a). No entanto, desde que as enzimas são absorvidas fisicamente na superfície da sílica, este tipo de imobilização pode formar biocatalisadores relativamente frágeis e reversíveis, podendo causar a lixiviação de enzimas, contaminar o meio de reação e ao mesmo tempo leva a uma fácil perda da atividade catalítica do biocatalisador (FACIN et al., 2019; HOMAEI et al., 2013).

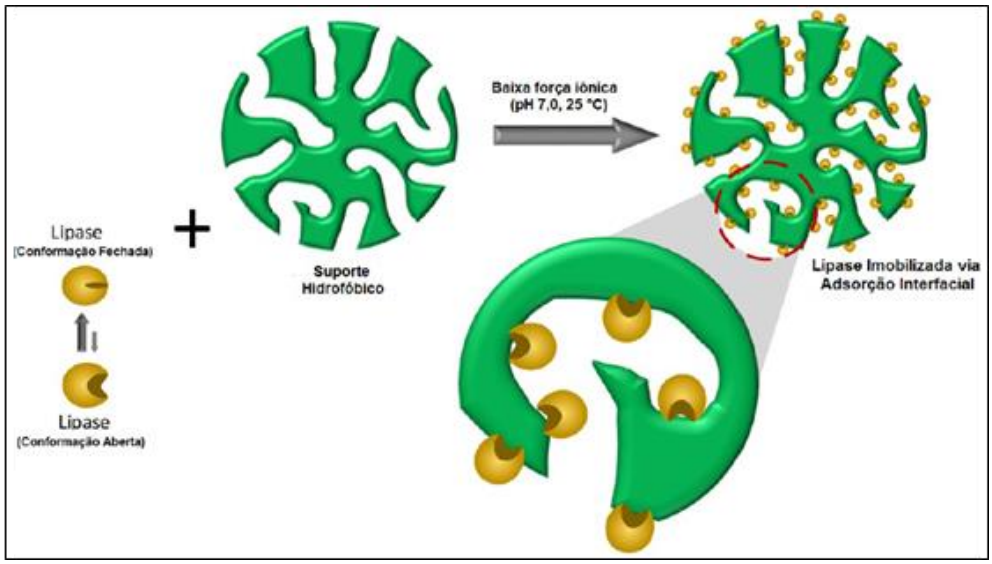


Figura 4 – Diagrama representativo da imobilização de lipases via ativação de interação em suportes hidrofóbicos.
Adaptado de: (BASSI et al., 2016)

No protocolo de adsorção física, as forças físicas envolvem apenas interações fracas para reter a enzima na superfície do suporte abarcando forças hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações de Van der Waals (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; HOMAEI et al., 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Normalmente, este processo de imobilização é realizado pelo contato direto da solução enzimática, geralmente aquosa, com o suporte (sólido) baixo condições favoráveis de reação estabelecendo-se interações entre a enzima e o suporte (ADLERCREUTZ, 2013). No caso das lipases, a interação hidrofóbica é a mais empregada industrialmente.

Além disso, a diferença de superfície das diferentes matrizes utilizadas no processo de imobilização, alterará significativamente as propriedades da lipase como atividade, estabilidade, seletividade ou especificidade (MUGO; AYTON, 2013; TUFIÑO et al., 2019). O

sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima num suporte dependerão do tamanho da proteína a ser absorvida, da área superficial do suporte, da sua porosidade e do tamanho dos poros. Portanto, a escolha do suporte adequado para a imobilização é um fator crucial no preparo de biocatalisadores, uma vez que o processo pode causar a desativação da lipase, limitações na transferência de massa e a diminuição da atividade específica da enzima (ADLERCREUTZ, 2013).

3.5 SUPORTES PARA A IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Na imobilização de lipases, a escolha do suporte a ser empregado é um fator crucial no processo da obtenção de biocatalisadores heterogêneos com elevada atividade catalítica e limitações de difusão mínimas das moléculas de reagentes e/ou produtos (ALVES; CREN; MENDES, 2016). Os materiais utilizados como matriz, devem contribuir para o bom desempenho do catalisador derivado, assim as principais características que estes devem cumprir são: grande superfície de contato (área superficial), não solubilidade no meio reacional a ser aplicado, estabilidade mecânica, alta porosidade e admitir a fixação da enzima sem afetar a sua atividade catalítica (CANTONE et al., 2013; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

A eficiência das preparações enzimáticas heterogêneas dependera das interações entre a enzima e o suporte, as quais fornecem todas as características bioquímicas, mecânicas e cinéticas ao biocatalisador derivado (CANTONE et al., 2013; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). Assim, a criteriosa seleção do suporte possibilita o aumento no rendimento de imobilização, o tempo de meia vida e a estabilidade operacional e térmica da enzima. Agora, se a escolha da matriz não for apropriada poderá influenciar negativamente na sua atividade catalítica, estabilidade operacional, térmica e de armazenamento, e na performance global do biocatalisador derivado (ALVES et al., 2017; BARBOSA et al., 2014; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). A Figura 5 mostra as principais características necessárias, entre o suporte e a enzima, para compor as propriedades generais do biocatalisador.

De acordo com um estudo realizado por Carvalho, Lima e Soares (2015), a escolha do suporte deve basear-se em três características principais: (i) químicas: fundamentadas na composição química e de superfície, estabilidade química e grupos funcionais do material e micro efeitos como pH, natureza hidrofóbica ou hidrofílica e presença de íons metálicos, (ii) mecânicas: baseadas no tamanho de partícula, diâmetro de poro, área superficial, volume

accessível do suporte e ao comportamento de compressão e compactação da matriz, abrasão e velocidade de sedimentação para distintos reatores e (iii) morfológicas: relacionadas à área superficial do material, rugosidade e porosidade da matriz: estrutura não porosa, porosa ou gel. Além de sua influência quanto à enzima imobilizada e da possibilidade de regeneração do suporte (CANTONE et al., 2013; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015).

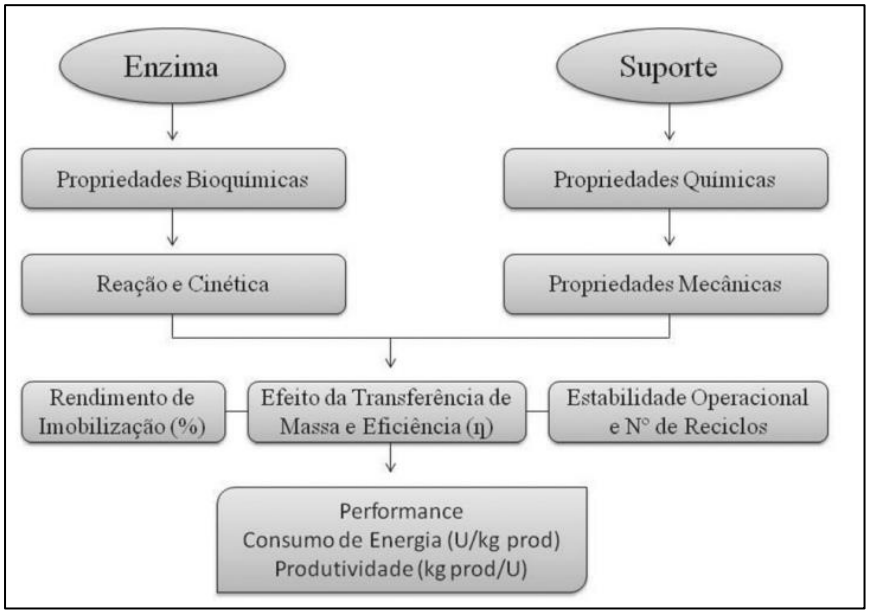


Figura 5 – Características intrínsecas do suporte e da enzima que influenciam nas propriedades globais do biocatalisador.
Adaptado de: (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015)

Além das características intrínsecas do suporte, outra condição de extrema importância a ser considerada na seleção da matriz é o seu custo financeiro, pois o preço deste material interfere diretamente na viabilidade econômica do processo de imobilização e, porém, na sua futura aplicação industrial (SCHERER et al., 2012).

Os suportes, podem ser categorizados baseando-se na sua composição (orgânicos ou inorgânicos), se são sintéticos ou naturais, ou considerando sua morfologia e porosidade (ALVES et al., 2017; FACIN et al., 2019; MOHAMAD et al., 2015). Em relação à composição, os materiais mais utilizados são os orgânicos, não obstante, os suportes inorgânicos são preferíveis para uso industrial por apresentarem grande resistência mecânica, estabilidade em ampla faixa de pressões, temperaturas e valores de pH, rigidez e resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano. Dentre os materiais utilizados como matrizes, os suportes naturais apresentam algumas vantagens sobre as matrizes de natureza sintética como baixo custo e facilidade de degradação. No entanto, os materiais sintéticos exibem distintas formas

físicas e estruturas químicas, podendo ser combinados para a criação de um suporte ideal (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Independentemente da natureza, a classificação dos suportes pode ser realizada de acordo ao tamanho e morfologia dos poros do material, devido a que dependendo da sua porosidade, a imobilização da enzima pode ocorrer na superfície e/ou no interior do suporte, sem afetar a estabilidade estrutural desta (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), os materiais porosos podem ser classificados, de acordo com o tamanho de seus poros, em três categorias: microporosos no caso de poros menores que 2 nm, mesoporosos para poros de 2 a 50 nm e macroporosos com poros maiores de 50 nm (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015). Os suportes micro ou mesoporosos são os mais indicados na imobilização de lipases (LI et al., 2010).

Na literatura especializada, são reportados distintos materiais que podem ser utilizados como matriz na imobilização de enzimas. Na Tabela 2 são apresentados diversos suportes utilizados na imobilização de lipases por distintos protocolos e sua classificação.

Tabela 2 – Levantamento bibliográfico de suportes empregados para a imobilização de lipases por distintos métodos.

Natureza	Classificação do suporte	Suporte	Lipase	Protocolo de imobilização	Ref.
Natural	Orgânico	Quitosana	*Candida rugosa* (tipo VII) e Pâncreas de porco	Adsorção física	PEREIRA; ZANIN; CASTRO, 2003
		Casca de arroz	*Thermomyces lanuginosus*	Ligação covalente	LIMA et al., 2018
		Bagaço da cana de açúcar	*Candida rugosa* (tipo VII)	Aprisionamento	FERRAZ et al., 2016
	Inorgânico	Argila	Pâncreas de porco	Adsorção física	SCHERER et al., 2012
		Nanofibra	*Candida Rugosa*		ZHU; SUN, 2012
Sintético	Orgânico	Poli-hidroxibutirato PHB	*Thermomyces lanuginosus*	Adsorção física	MIRANDA et al., 2014
		Poli (metacrilato-co-divinilbenzeno)	*Staphylococcus haemolyticus*	Adsorção física/ Aprisionamento	KIM et al., 2013
		Poli-metacrilato	*Thermomyces lanuginosus*	Adsorção física	BASSI et al., 2016
	Inorgânico	Sílica	*Pseudomonas fluorescens*	Adsorção física	LIMA; PERES; MENDES, 2018
			Bacillus sp ITP-001	Processo sol-gel	CARVALHO et al., 2013
		Alumina (Al_2O_3)	*Bacillus* sp.	Ligação covalente	KUMAR et al., 2013

Fonte: Adaptada e modificada de CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015.

Como observado, existem diferentes matérias-primas orgânicas naturais que têm sido usadas como suportes, promovendo principalmente o uso de resíduos agroindustriais, tal como a sílica obtida da casca de arroz. Materiais a base de sílica têm sido os suportes inorgânicos preferidos na preparação de biocatalisadores via adsorção física devido às suas propriedades superficiais, alta estabilidade térmica e mecânica e baixa toxicidade (DORCHEH; ABBASI, 2008; VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015). Além disso, a superfície dessa matriz pode ser facilmente modificada por diferentes grupos funcionais, a fim de melhorar a sua capacidade de retenção de enzimas, resultando em biocatalisadores mais estáveis, resistentes e versáteis (HOMEI et al., 2013; LIMA et al., 2015).

3.5.1 Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de suportes a base de sílica

O reaproveitamento de resíduos sólidos gerados pela indústria dos alimentos tem recebido grande atenção devido as grandes quantidades produzidas ao longo de sua cadeia produtiva. Dentre estes, os principais subprodutos gerados são cascas, caroços, sementes, bagaços e tortas, os quais acarretas inúmeros problemas ambientais, além de gastos econômicos de armazenamento. Para minimizar o impacto de estes resíduos, estes são destinados principalmente para a produção de energia, como fertilizantes ou bem na ração animal. Porém, novas aplicações têm sido propostas na produção de produtos valiosos e diversificados, gerando valor ao resíduo (VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015).

A utilização de subprodutos da indústria alimentícia como suportes na imobilização enzimática, tais como fibra de coco verde, bagaço de cana-de-açúcar, casca de amendoim e arroz e talos de milho, tem sido amplamente estudada (LIMA; PERES; MENDES, 2018; LV et al., 2013; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013; VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015). Estes resíduos podem ser reaproveitados *in natura* – processos físicos de moagem, peneiramento e lavagem, ou bem, modificados quimicamente mediante tratamentos hidrotérmicos e/ou utilizando diferentes aditivos ou agentes funcionalizantes que permitam o aprimoramento destes materiais (VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015).

O dióxido de silício (SiO_2), melhor conhecido como sílica, é um composto com elevado potencial para sua utilização como matriz na imobilização de lipases, principalmente devido às suas características superficiais (grande área e diâmetro uniforme dos poros), alta

estabilidade (térmica e mecânica) e baixa toxicidade (DORCHEH; ABBASI, 2008). Este composto químico, pode ser encontrado na natureza na sua forma pura ou como mineral. No mercado internacional, partículas de SiO_2 são amplamente comercializadas por diferentes empresas, e o custo deste material varia de R$ 309,00/kg a R$ 1557,00/g (SIGMA-ALDRICH, 2020a). Mas também, podem ser produzidas mediante a técnica sol-gel utilizando diferentes precursores silano, ou bem, mediante o tratamento hidrotérmico de resíduos agroindustriais (WANG et al., 2016).

O preço do suporte, é uma das características mais importantes que deve ser considerada na escolha do mesmo, já que intervém diretamente na viabilidade econômica do processo de imobilização e na sua futura escalação industrial (SCHERER et al., 2012). Assim, diversos estudos tem sido desenvolvidos com a finalidade de produzir partículas de sílica de baixo custo, a partir do tratamento hidrotérmico de distintos subprodutos da agroindústria (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; LIMA, et al., 2015; VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015; VESCOVI, et al., 2016).

Com base em seu baixo custo, suas propriedades físico-químicas relevantes e sua fácil obtenção, a sílica obtida a partir dos subprodutos gerados no setor agroindustrial, especialmente a casca de arroz, tem sido aplicada para gerar produtos de alto valor agregado. A SiO_2 da casca de arroz tem sido utilizada em diversos setores como aditivo para a produção de concreto e argamassas, como adsorvente para corantes orgânicos, na remoção de contaminantes de efluentes industriais e na produção de baterias e supercapacitores (CUI et al., 2017; LIU et al., 2015; MOR; CHHODEN, RAVINDRA, 2016; SHEN, 2017). No entanto, sua aplicação como suporte para preparar biocatalisadores heterogêneos altamente ativos e estáveis ainda é pouco relatada na literatura especializada.

3.5.2 Sílica de casca de arroz como suporte

A cultura do arroz (*Oryza sativa L.*), e o próprio grão, em conjunto com seus derivados, podem ser considerados como fonte alimentar básica no mundo e como principal fonte de renda para mais de um bilhão de famílias da Ásia, África e América do Sul (KUMAR et al., 2016; MURARO; OLIVEIRA; DENIS, 2018; OLI et al., 2014). Segundo um relatório apresentado pela CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, na safra de 2019/2020, estima-se uma produção mundial de arroz de aproximadamente 497,8 milhões de toneladas. Onde, somente

no Brasil, a produção de arroz na mesma safra é estimada em cerca de 10,6 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

Durante o processamento do arroz, em média 22% da massa do grão geram o subproduto denominado casca de arroz (KUMAR et al., 2016; OLI et al., 2014). Considerando os efeitos contaminantes desse resíduo, é importante avaliar distintas alternativas que permitam sua correta disposição ou reaproveitamento e, ao mesmo tempo, sejam econômica e ambientalmente interessantes. Uma vez extraída a matéria orgânica e os compostos alcalinos indesejáveis, as cinzas da casca de arroz são ricas em sílica, podendo conter até 96% desse óxido em sua composição (AYSWARYA et al., 2012; MACHADO, 2018). A sílica presente na casca de arroz, além de poder ser extraída por simples processo de combustão, também pode ser obtida através do tratamento hidrotérmico com distintos ácidos em diferentes concentrações, seguido de lavagem com água destilada e queima dos resíduos orgânicos a altas temperaturas. De essa maneira, é possível solubilizar grande parte dos traços de outros elementos como potássio, magnésio, cálcio, alumínio e sódio (MADDULURI et al., 2020; SOUZA; MAGALHÃES; PERSEGIL, 2002).

Assim, atualmente diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de analisar a aplicação da sílica da casca de arroz em processos com grande valor agregado, tais como substituição do talco na fabricação de autopeças, componente de cimento e argamassas, produção de adsorventes para corantes orgânicos e remoção de contaminantes de efluentes industriais (íons e CO_2), limpeza de agua de esgoto, obtenção de suportes para catalisadores e na produção de baterias e supercapacitores (MURARO; OLIVEIRA; DENIS, 2018; ZHANG et al., 2017).

Embora a utilização da sílica da casca de arroz como suporte na obtenção de biocatalisadores seja atraente já que apresenta excelentes características de superfície, estabilidade térmica e mecânica, resistência ao ataque microbiano e baixa toxicidade (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; CORICI et al., 2016; HE et al., 2016), este material utilizado na sua forma pura, apresenta algumas barreiras como elevada capacidade de retenção de compostos hidrofílicos. Em reações em meio orgânico, como esterificação e transesterificação, moléculas de água e glicerol são produzidas, as quais por interação via ligação de hidrogênio com os grupos silanóis (Si-OH) presentes na estrutura da sílica, são acumuladas no microambiente do suporte (SALIBA et al., 2016). A retenção de estes compostos hidrofílicos na superfície da matriz reduz drasticamente a atividade catalítica dos derivados, já que favorecem a dessorção da enzima e induzem a formação de uma camada

superficial hidrofílica, dificultando a partição de substratos hidrofóbicos no seu microambiente, comprometendo o processo de transferência de massa e o rendimento de reação.

Com o intuito de superar estas desvantagens e tornar o suporte mais eficiente ao processo de imobilização de enzimas e criar derivados mais estáveis e ativos, distintas estratégias são propostas para aperfeiçoar a interação enzima-suporte. Estas melhorias envolvem modificações químicas na superfície da sílica mediante introdução por ligações covalentes de diferentes grupos funcionais tais como: alquila, amino, carboxila, dentre outros, os quais possibilitam a orientação da enzima ao suporte por diferentes regiões (BOLINA et al., 2018; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; HOMAEI et al., 2013). A ativação da sílica – funcionalização, ocorre quando um agente alcóxi-silano passa a ser quimicamente ligado covalentemente à sua superfície.

A introdução destes grupos, que promovem a funcionalização e ativação do suporte, pode ser realizada na superfície da matriz por adsorção física, é dizer modificação química reversível, ou bem, mediante ligação covalente –irreversível (BOLIVAR; NIDETZKY, 2012). A ativação da sílica pode ocorrer em uma única reação como na síntese realizada por Blanco et al. (2004) na ativação da sílica com octil-(trietóxi)-silano (BLANCO et al., 2004). Ou então por duas ou mais reações sequenciais, como a realizada por Bolina e colaboradores (2018), em que dois suportes a base de sílica foram inicialmente ativados com GPTMS (glixidóxi-propil-trimetóxi-silano) e depois outra reação com glicina foi realizada para a introdução dos grupos iônico a fim de realiza a imobilização por interações iônicas da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) (BOLINA et al., 2018).

A grande vantagem da utilização da sílica funcionalizada resulta da possibilidade da reciclagem do substrato adsorvente. Este processo de modificação da superfície da sílica, promove um carregamento alto e mais homogêneo da superfície com grupos organossilanos (MACHADO, 2018). A funcionalização da sílica com trietóxi(octil)silano (OCTES) aumenta significativamente a hidrofobicidade do suporte, o que é interessante para imobilização de lipases que já que apresentam elevada afinidade com superfícies altamente hidrofóbicas, melhorando a difusão de substratos hidrofóbicos ao microambiente do biocatalisador (BLANCO et al., 2004; MACHADO, 2018).

Por tais motivos, no presente projeto de mestrado, é proposta a utilização da sílica da casca de arroz funcionalizada com OCTES para a imobilização por adsorção física de três lipases diferentes (LTL, LCR e LPF). Os biocatalisadores obtidos foram empregados na reação de esterificação para produção do éster com propriedades surfactantes (palmitato de solketila).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase® 100L), lipase tipo VII de *Candida rugosa* e de *Pseudomonas fluorescens* foram adquiridas da Sigma Aldrich Brasil. Casca de arroz foi fornecida pela empresa Arroz Rei de Ouro Ltda. (Itajubá, MG, Brasil). Trietóxi(octil)silano (OCTES) foi adquirido da Sigma-Aldrich. Solketal (DL-1,2–Isopropilidenoglicerol) e o ácido palmítico foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. Peneira molecular UOP 3Å (forma de bastão e tamanho 1/16 pol) também foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. O azeite de oliva de baixa acidez (Carbonell) foi adquirido no comércio local. Goma arábica foi comprada da Synth® (São Paulo, SP). Albumina de soro bovina (BSA) foi adquirida da Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA). O ágar Mueller – Hinton (MHA), o ágar Sabouraund de dextrose (SDA), o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), sal de sódio de resazurina em pó, a amoxicilina e o fluconazol foram adquiridos na HiMedia Laboratories (Mumbai, MH, Índia). Todos os outros reagentes empregados (solventes e reagentes químicos) de grau analítico foram obtidos da Synth® (São Paulo, SP).

4.2 PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA VIA PROCESSO HIDROTÉRMICO

As partículas de sílica foram preparadas segundo a metodologia descrita por Zhang et al. (2017), com pequenas modificações (Figura 6). Inicialmente, as cascas de arroz foram secas por aproximadamente 15 h, a 80°C. 30 g de casca de arroz seca foram refluxadas com 400 mL (v/v) de solução de água deionizada com ácido clorídrico (35% m/m) na proporção de 9:1, respectivamente, por 2h a 120°C para remoção das impurezas metálicas. As cascas de arroz tratadas foram filtradas, lavadas com água deionizada e calcinadas em mufla a 700°C por 4 h para obter partículas de sílica (SiO_2) (ZHANG et al., 2017). De acordo com Machado e colaboradores (2019), a porcentagem de rendimento da SiO_2 foi de 11,2 ± 1,1% com base na massa seca inicial (MACHADO et al., 2019).

Figura 6 – Esquema representativo da obtenção da sílica de casca de arroz
Fonte: Do autor

4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA COM OCTES

A preparação de Octil-SiO_2 utilizando OCTES foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vescovi et al. (2016). Uma suspensão contendo 1 g da SiO_2 seca e 20 mL de uma mistura de precursor alcóxi-silano (OCTES) e tolueno (na proporção OCTES:tolueno de 1:10 v/v) foi mantida sob refluxo por 4h a 120°C. O suporte funcionalizado foi filtrado em um funil de Buchner, usando papel de filtro Whatman no.41, e lavado com acetona, etanol e água destilada. Após a lavagem, o suporte foi estocado a 40°C por 24 h em estufa de secagem (VESCOVI et al., 2016).

4.4 PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES VIA ADSORÇÃO HIDROFÓBICA

O procedimento de imobilização por adsorção física em Octil-SiO_2 foi realizado de acordo com prévios estudos realizados no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG como mostrado na Figura 7 (ALVES et al., 2017; LAGE et al., 2016; MIRANDA et al., 2014; TODERO et al., 2015). O procedimento de imobilização de LTL consistiu na preparação de uma suspensão contendo solução enzimática previamente preparada em solução tampão de fosfato de sódio pH 5,0 e o suporte, na proporção 1:19 (g/mL) (suporte:solução enzimática). No caso das lipases LCR e LPF, as soluções enzimáticas foram previamente centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min com a finalidade de eliminar sólidos existentes em suas formulações comerciais.

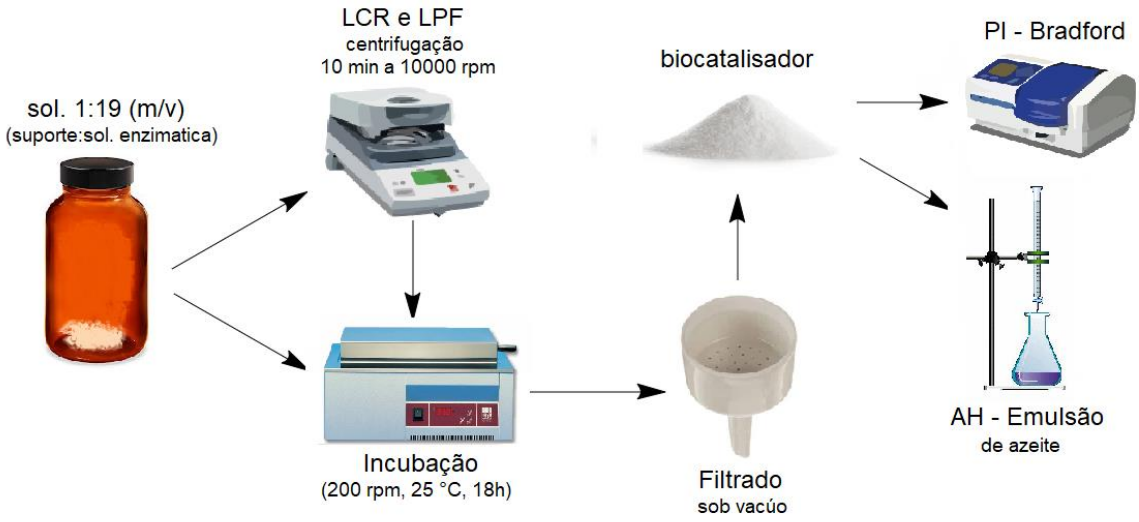


Figura 7 – Esquema representativo da preparação e determinação dos parâmetros dos biocatalisadores.
Fonte: Do autor

O carregamento de proteína a ser empregado nestes testes foi de 40 mg/g de suporte (MACHADO et al., 2019). As suspensões foram mantidas sob agitação constante em um agitador orbital a 200 rpm e incubada a 25°C por 18 h. Subsequentemente, os biocatalisadores preparados foram filtrados sob vácuo em funil de Buchner com papel de filtro (Whatman N° 41) e lavados exaustivamente com água destilada. O processo de adsorção foi monitorado pela medição da concentração de proteína na solução do sobrenadante. Após a imobilização, os biocatalisadores preparados foram armazenados a 4°C por 24 h antes do uso.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO

Neste estudo, a atividade hidrolítica (AH) da lipase livre e imobilizada foi determinada na hidrólise de uma emulsão de azeite, de acordo com a metodologia apresentada por Soares et al. (1999). A emulsão foi preparada pela mistura de 50 g de azeite, com 150 g de solução de goma arábica a 3% (m/m). A mistura reacional consistiu em 5 g do substrato (emulsão) e 5 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 8,0 (100 mM) inserida em frascos Erlenmeyer de 125 mL e incubados em um agitador de banho convencional com controle de temperatura a 37°C e 200 rpm por 5 min (SOARES et al., 1999). A reação hidrolítica começou com a adição de 0,1 mL de solução enzimática ou 0,1 g dos biocatalisadores imobilizados preparados. Após a reação de hidrólise, 10 mL de etanol a 95% m/m foram adicionados a esta mistura reacional para paralisar a reação (inativação da enzima) e titulada com solução de NaOH (35 mM), usando

fenolftaleína como indicador para a quantificação dos ácidos graxos liberados na reação. A atividade da lipase foi determinada de acordo com a Eq. (1). Uma unidade internacional (U) de atividade hidrolítica foi definida como a massa de enzima necessária para liberar 1 μmol de AGL por minuto de reação nas condições experimentais descritas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\mathrm{AH}\left(\frac{\mathrm{U}}{\mathrm{g}}\right) = \frac{(\mathrm{V_A} - \mathrm{V_C}) \times \mathrm{M_{NaOH}} \times 1000}{\mathrm{t} \times \mathrm{m}} \quad (1)$$

Em que: AH é a atividade hidrolítica expressa em U/g de biocatalisador. V_A é o volume de solução de NaOH usado na titulação da amostra (mL), V_C é o volume gasto da mesma solução de sódio para titular a amostra controle – sem enzima (mL). M_{NaOH} é a concentração molar da solução de NaOH padronizada utilizada na titulação (mol/L), t é o tempo de reação expresso em minutos e m é a massa do biocatalisador (g).

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford, empregando BSA como proteína padrão (BRADFORD, 1976). A concentração de proteína imobilizada (PI – mg/g de suporte) foi determinada segundo a Eq. (2).

$$\mathrm{PI(mg/g\ de\ suporte)} = \frac{\mathrm{V} \times (\mathrm{C_0} - \mathrm{C_e})}{\mathrm{m}} \quad (2)$$

Em que PI é a concentração de proteína imobilizada (mg/g de suporte), V é o volume de solução enzimática (mL), C_0 é a concentração de proteína inicial (mg/mL), C_e é a concentração de proteína após imobilização (mg/mL) e m é a massa de suporte (g).

A atividade específica (AE) foi determinada como mostrado na Eq. (3) (LAGE et al., 2016; ALVES et al., 2017):

$$\mathrm{AE\ (U/mg\ de\ PI)} = \frac{\mathrm{AH}}{\mathrm{PI}} \quad (3)$$

Em que AH é a atividade hidrolítica aparente do biocatalisador preparado (U/g de suporte) e PI é a concentração de proteína imobilizada (mg/g de suporte)

A energia livre de Gibbs (ΔG) para o processo de adsorção foi determinada de acordo com a Eq. (4) (ALVES et al., 2017; SONG et al., 2016):

$$\Delta G = -RT \ln K_c \qquad \therefore K_c = \frac{PI}{C_e} \tag{4}$$

Em que ΔG é a energia livre de Gibbs (kJ/mol), R é a constante universal dos gases (8,314 x10^{-3} kJ/mol K), T é a temperatura absoluta de adsorção (298,15 K) e K_c é a constante de equilíbrio determinada como sendo a relação entre a concentração de proteína imobilizada (PI) e a concentração de proteína residual na solução sobrenadante (C_e) no equilíbrio, respectivamente.

4.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DO PALMITATO DE SOLKETILA

A atividade catalítica dos biocatalisadores imobilizados em meio orgânico foi determinada na síntese do éster palmitato de solketila (biossurfactante) via reação de esterificação direta do ácido palmítico e solketal em meio orgânico. A Figura 8, mostra um esquema representativo da reação de esterificação desenvolvida neste trabalho.

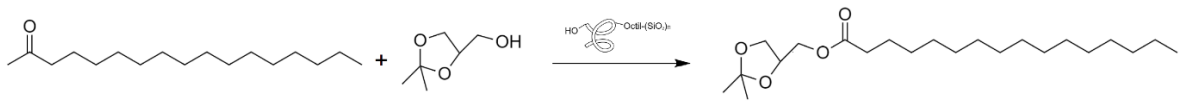


Figura 8 – Reação de esterificação do ácido palmítico com solketal utilizando os biocatalisadores
Fonte: Do autor

A reação de síntese foi conduzida em frascos de vidro fechados (frascos de Duran) com capacidade para 100 mL contendo 6 mL de meio reacional (0,2 mol/L de cada reagente) incubada em um banho termostatizado com agitação (240 rpm) a 40°C, o procedimento geral é ilustrado na Figura 9. A reação foi iniciada pela adição direta de 300 U dos biocatalisadores previamente preparados, que corresponde a 0,46 g de LTL–Octil–SiO_2, 0,56 g de LPF–Octil–SiO_2 e 0,94 g de LCR–Octil–SiO_2. Alíquotas foram retiradas da mistura reacional em diferentes intervalos de tempo (200 μL), para cada sistema de reação. As alíquotas foram diluídas em 10 mL de solução de álcool (95% m/m) e tituladas com solução de NaOH 35 mM, utilizando fenolftaleína como indicador para determinar a concentração de ácido palmítico residual e estimar a porcentagem de conversão (Y), conforme Eq. (5) (ALVES et al., 2017; LAGE et al., 2016; MIRANDA et al., 2014).

$$Y(\%) = \left(\frac{A_0 - A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad (5)$$

Em que: A_0 a concentração inicial de ácido palmítico (mM) e A_t é a concentração de ácido palmítico em determinado tempo de reação (mM).

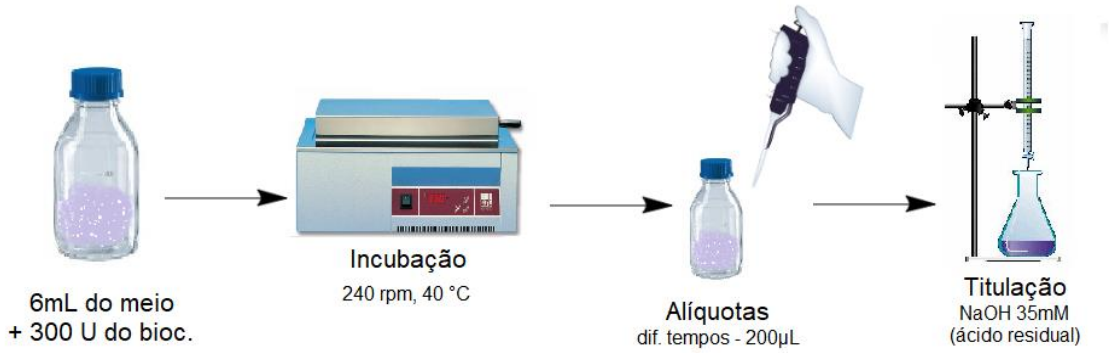


Figura 9 – Reação de esterificação do ácido palmítico com solketal utilizando os biocatalisadores
Fonte: Do autor

4.7 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE REAÇÃO

4.7.1 Efeito da fonte de lipase na síntese do éster

Com a finalidade de determinar o melhor biocatalisador na síntese de palmitato de solketila, além dos rendimentos de esterificação, a produtividade (P – mmol de ácido graxo convertido min^{-1} g^{-1}) dos biocatalisadores foi calculada mediante a Eq. (6).

$$P = \frac{MEC\ (mmol)}{t_{MEC}\ M_{enz}} \quad (6)$$

Em que: MEC é a produção máxima do éster (mmol), t_{MEC} é o tempo necessário para atingir dita produção – equilíbrio (min) e M_{enz} é a massa de biocatalisador utilizada (g).

O biocatalisador que demostrou a maior produtividade na reação de esterificação foi selecionado para estudos subsequentes da otimização de parâmetros de processo.

4.7.2 Otimização dos parâmetros por delineamento composto central rotacional (DCCR)

A síntese enzimática de palmitato de solketila foi otimizada empregando um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 – O processo experimental deste planejamento, consiste na realização de testes para cada uma das combinações da matriz experimental, com a finalidade de identificar e interpretar os efeitos principais de interação dos fatores estudados, e com isso, determinar as melhores condições experimentais do processo. Um experimento fatorial 2^3 considera o estudo de três fatores (x_1, x_2 e x_3), cada um desses parâmetros testado com dois níveis (-1 e +1) (CARDOZA GALDÁMEZ, 2002) – consistindo de 18 experimentos nos quais quatro ensaios no ponto central, seis nos pontos axiais e oito ensaios fatoriais. Os níveis de cada variável foram escolhidos baseados em testes preliminares realizados no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL – MG (MIGUEZ et al., 2018; ALVES; CREN; MENDES, 2016; LAGE et al., 2016). As reações de esterificação foram realizadas em ordem aleatória, mantendo-se fixa a agitação (incubadora rotativa orbital – 240 rpm) e tempo de reação (15 min). Os parâmetros estudados e seus níveis foram: temperatura (20 a 60ºC), concentração de biocatalisador (100 a 1500 U) – o derivado foi colocado aleatoriamente (em suspensão) na mistura reacional, e razão molar de ácido:álcool (1:1 a 1:5).

A conversão (%) foi considerada como variável resposta. Os resultados experimentais foram analisados ao nível de 95% de confiança, utilizando o software Statistica versão 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste *t* de Student. O ajuste do modelo foi expresso pelo coeficiente de determinação (R^2) e os níveis de significância dos parâmetros do modelo foram verificados por análise de variância (ANOVA). As superfícies de resposta (RSM) foram plotadas com o intuito de encontrar as condições ótimas de reação.

4.7.3 Efeito da concentração da peneira molecular na síntese do éster

O efeito da concentração da peneira molecular (0, 5, 10, 15 e 20% m/v de mistura reacional) na síntese do palmitato de solketila foi avaliado nas condições ótimas (56°C, concentração do biocatalisador de 800 U – ou 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação e razão molar de ácido:álcool de 1:3 em meio de heptano). A peneira

molecular foi previamente ativada em forno mufla por 4h a 250°C. As reações foram conduzidas por 15 min de incubação em banho termostático e agitação constante (240 rpm).

4.7.4 Efeito da concentração inicial dos reagentes

O efeito da concentração inicial dos reagentes de 200 a 1000 mM de ácido palmítico na razão 1:3 (ácido:álcool) na síntese do éster palmitato de solketila foi avaliado nas condições ótimas (56°C, concentração do biocatalisador de 800 U – 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação, ausência de peneira molecular, e razão molar de ácido:álcool de 1:3 em meio de heptano). As reações foram realizadas por 220 min de incubação em banho termostático e agitação constante (240 rpm). Além disso, a esterificação foi também realizada em um sistema isento de solvente orgânico (concentração inicial de ácido palmítico de 1,45 M) nestas mesmas condições experimentais com o intuito de avaliar o efeito do solvente orgânico na reação.

4.8 TESTES DE REUSO DO BIOCATALISADOR

Testes de reuso do biocatalisador foram realizados após 7 sucessivos ciclos de reação de 150 min cada. As reações foram realizadas nas condições experimentais ótimas previamente estabelecidas: 56°C, concentração do biocatalisador de 800 U – 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação, ausência de peneira molecular e razão molar de ácido:álcool de 1:3 com concentração inicial de ácido palmítico de 1 M, em meio de heptano. No final de cada ciclo, o biocatalisador heterogêneo foi removido do meio de reação por filtração, lavado com hexano gelado em excesso para remover moléculas de qualquer substrato e/ou produto retidos em seu microambiente e filtrado sob vácuo a temperatura ambiente (25°C) por 2 h para eliminar as moléculas de água produzidas na reação. Após este procedimento, o biocatalisador foi introduzido em um novo meio reacional. A porcentagem de conversão (Y) foi determinada após cada ciclo de reação.

4.9 PURIFICAÇÃO DO ÉSTER

A purificação do éster foi realizada por cromatografia de camada delgada (CCD). Inicialmente, o biocatalisador foi separado do sistema de reação por filtração a vácuo em um funil de Buchner. O meio reacional incubado em refrigerador a 4°C por 12 h para a precipitação do ácido palmítico residual e separado por filtração a vácuo. A solução obtida foi incubada em um rotaevaporador para a remoção do solvente. Posteriormente, a solução contendo palmitato de solketila e solketal residual foram incubados em sulfato de sódio, previamente incubado a 250°C por 4 h e resfriado até temperatura ambiente por 18 h para a remoção de água.

O produto foi separado da mistura por meio de um cartucho empacotado com sílica gel marca Waters-Sep-Pak (Vac 35cc – Sílica 10 g) utilizando hexano/acetato de etila (razão volumétrica de 9:1) como eluente. O eluente utilizado foi testado inicialmente utilizando CCD em cada mistura a fim de verificar a eficácia do mesmo na separação do produto. O cartucho foi condicionado utilizando quantidade suficiente de hexano, quando este estiver mais próximo possível do nível da sílica foi introduzida a amostra a ser separada. O eluente foi continuamente adicionado à coluna (iniciando com hexano e depois proporções hexano:acetato de 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 e lavado com acetato de etila e metanol, para assegurar a purificação do éster). As amostras foram coletadas seguidamente em pequenas quantidades utilizando tubos de ensaio devidamente enumerados. A técnica CCD foi empregada para auxiliar na análise das amostras coletadas. Ao final da separação, o conteúdo dos tubos onde se identificam os produtos puros foram reunidos, e posteriormente incubados em rotaevaporador para a remoção do eluente.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DO ESTER – PALMITATO DE SOLKETILA

4.10.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) foram registrados em um espectrômetro Bruker AC300 (Bruker BioSpin, Alemanha), localizado no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL – MG. As soluções foram preparadas utilizando-se $CDCl_3$ (clorofórmio deuterado) como solvente e colocadas em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro (LAGE et al., 2016).

4.10.2 Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica. Testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

A atividade antimicrobiana *in vitro* do éster foi avaliada de acordo com a metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2015) para bactérias e CLSI (2008) para leveduras, com algumas modificações. O teste foi realizado em meio Muller Hinton (MHA) para atividade contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 4555) e no meio do Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para atividade contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e *Candida parapsilosis* (ATCC 2209).

O éster foi solubilizado em 125 µL de etanol absoluto, produzindo uma solução de 8 mg mL^{-1}. A solução de éster foi colocada em placas de 96 poços sob diluições em série (400 - 3.125 µg mL^{-1}). O inóculo foi preparado como uma suspensão padronizada em um espectrofotômetro a 660 nm e transmitância de 75%, correspondendo a 1,5 x 10^8 UFC mL^{-1} (unidades formadoras de colônias). Amoxicilina (10 – 0,078 µg mL^{-1}) e Fluconazol (80 – 0,625 µg mL^{-1}) foram utilizados como controle positivo.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Solução de resazurina 0,2% m/m foi adicionada a cada poço para indicar a viabilidade de microrganismos na determinação da CIM (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007). A menor concentração, na qual a cor não variou, foi considerada o valor da CIM. Os controles de esterilidade do meio de cultura, inóculos e etanol foram preparados como controles negativos. Em relação à avaliação da CMM, uma alíquota de 25 µL foi removida de cada poço que não apresentava alteração de cor (para amostras ou antimicrobianos) e aplicada à superfície de uma placa de Petri contendo ágar Muller Hinton (MHA) para bactérias e ágar Sabouraud (SHA) para leveduras. Eles foram incubados a 37°C por 24 h. O crescimento bacteriano ou fúngico indica que o extrato não exerceu ação bactericida ou fungicida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O esquema representativo da funcionalização e adsorção física das enzimas utilizando Octil-SiO_2 como suporte está representado na Figura 10.

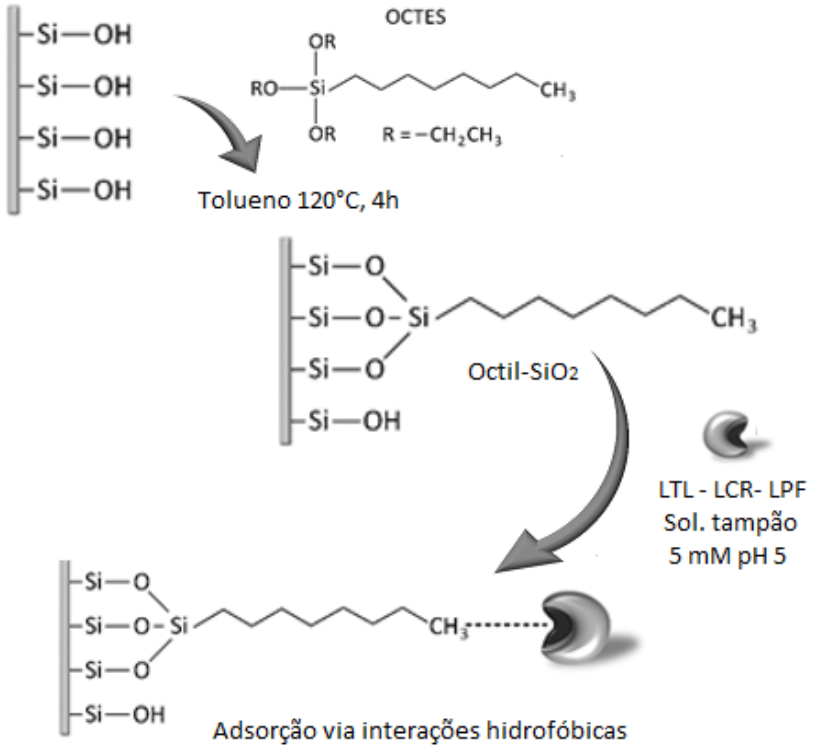


Figura 10 – Esquema representativo da funcionalização da sílica obtida da casca do arroz com OCTES e a adsorção física das lipases no suporte prepara**d**o.
Adaptado e modificado de (MACHADO et al., 2019).

A imobilização por adsorção das lipases em Octil-SiO_2 ocorreu mediante o mecanismo de ativação interfacial das lipases em superfícies hidrofóbicas, na qual as regiões hidrofóbicas que circundam o sítio ativo das lipases interagem com os grupos octil inseridos na superfície do suporte após o processo de sinalização (LIMA et al., 2015; MACHADO, 2018; VESCOVI et al., 2016). Algumas lipases, incluindo as lipases de LTL, LCR e LPF, reconhecem estes suportes como sendo similar ao seu substrato natural – gotas de óleo – (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; ZHAO et al., 2015a). Neste sentido, os sítios ativos da enzima são orientados para a superfície do suporte. Estudos anteriores efetuados por nosso grupo de estudos, realizaram a caracterização do suporte (Octil-SiO_2) e do biocatalisador derivado da imobilização da LTL nesse material, com a finalidade de confirmar o processo de funcionalização da sílica e de adsorção física da lipase (MACHADO, 2018; MIGUEZ et al., 2018).

5.1 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES CATALÍTICAS DOS BIOCATALISADORES NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE

De acordo com o estudo realizado por Machado e colaboradores (2009), o suporte preparado (Octil-SiO_2) exibiu um tamanho médio de partícula de 269,1 μm, área superficial específica de 196,0 m^2/g e um diâmetro médio de poro de 36,2 Å (MACHADO et al., 2019). Com base nas informações sumarizadas na Tabela 3, as três lipases estudadas LTL, LPF e LCR apresentam um diâmetro molecular maior ao tamanho do poro do suporte (Octil-SiO_2). Estes resultados sugerem preferencial adsorção das lipases na superfície externa do suporte. Isto indica que o acesso dos materiais de partida para as reações de hidrólise e esterificação poderiam ser controladas pela agitação. Deste modo, estas reações foram conduzidas sob agitação de 200 rpm para hidrólise e 240 rpm para esterificação, com base em um estudo anterior realizado em nosso grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2019).

Tabela 3 – Características estruturais das preparações de lipases u**t**ilizadas neste estudo

Lipase	Fonte	Concentração de proteína[a] (mg/g)	Massa molecular (kDa)	Diâmetro molecular (Å)
LTL	*Themomyces Lanuginosus*	17,60	31,7[b]	53,2[b]
LPF	*Pseudomonas fluorescens*	24,40	29[c]	50[c]
LCR	*Candida rugosa*	24,53	60[c]	68[c]

[a] Determinado pelo método de Bradford
[b] Referencia: FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010
[c] Referencia: NEVES PETERSEN; FORJAN; PETERSEN, 2001

As propriedades catalíticas dos distintos biocatalisadores preparados também foram determinadas na hidrólise da emulsão de azeite (Tabela 4). Com relação à carga proteica imobilizada, os valores observados foram da ordem 20 a 22 mg/g de suporte para todas as lipases testadas. Por outro lado, o biocatalisador preparado com LTL (LTL-Octil-SiO_2) foi o biocatalisador mais ativo na hidrólise de azeite (656 ± 24 U/g de biocatalisador), seguido pelos catalisadores de LPF (533 ± 43 U/g) e LCR (320 ± 49 U/g). Do mesmo modo, o biocatalisador com maior atividade especifica foi também o LTL-Octil-SiO_2 (31 ± 4 U/mg_{PI}).

Tabela 4 – Propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados via ativação interfacial das lipases em partículas de Octil-SiO_2

Lipase	Proteína imobilizada (mg/g)	Atividade hidrolítica (U/g)	Atividade específica (U/mg_{PI})	Ce (mg/g)	Ke	ΔG (kJ/mol)
LTL	21 ± 2	656 ± 24	31 ± 4	5×10^{-1}	40	-9
LPF	19 ± 2	533 ± 43	27 ± 4	7×10^{-1}	28	-8
LCR	22 ± 3	320 ± 49	15 ± 3	4×10^{-1}	50	-10

A espontaneidade do processo de adsorção pode ser explicada pela determinação da energia livre de Gibbs (ΔG). Os valores da constante de equilíbrio (K_e) foram utilizados para determinar os valores aparentes de ΔG que variaram de –10 a –8 kJ/mol. Estes valores mostram que a preparação destes biocatalisadores via adsorção das três lipases (LTL, LPF e LCR) no suporte foi um processo espontâneo. De acordo com a literatura especializada, valores aparentes de ΔG variando de 0 a –20 kJ/mol correspondem a um processo de fisissorção, enquanto que um processo de quimissorção estes valores variam de –80 a –400 kJ/mol (TU et al., 2009). Consequentemente, é possível notar que o processo de imobilização das três enzimas estudadas procedeu via interações físicas (fisissorção).

5.2 SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BIOSSURFACTANTE POR ESTERIFICAÇÃO

Os biocatalisadores preparados foram usados na síntese de éster de ácido palmítico e solketal em meio orgânico. Neste trabalho, a fim de otimizar a sínteses do palmitato de solketila, a influência de relevantes fatores incluindo fonte de lipase, temperatura de reação, concentração do biocatalisador, razão molar ácido:álcool, concentração de reagentes e efeito da peneira molecular na produção do éster foi avaliada. Nestes experimentos, lipases livres (extratos líquidos ou em pó) não foram testadas devido à sua má dispersão no meio reacional, baixa estabilidade em meios orgânicos e alta suscetibilidade aos efeitos inibitórios dos reagentes (BASSI et al., 2016; MENDES et al., 2012; SILVA et al., 2014). Por outro lado, estas limitações podem ser superadas com a imobilização por ativação interfacial das lipases em suportes hidrofóbicos, melhorando fortemente a dispersão das moléculas de enzima e a partição de moléculas dos reagentes no microambiente dos biocatalisadores (BASSI et al., 2016; BASSI et al., 2016; MIRANDA et al., 2014).

A síntese enzimática de uma variedade de ésteres de interesse industrial é efetuada em meio de solventes orgânicos a fim de aumentar a solubilidade dos reagentes na mistura reacional e torná-los mais acessíveis ao microambiente do biocatalisador. Além disso, a presença de solventes orgânicos como meios de reação pode deslocar o equilíbrio para a síntese de éster (KUMAR et al., 2016). Várias lipases têm demostrado alta estabilidade na incubação em solventes altamente hidrofóbicos, por esse motivo as reações de esterificação foram realizadas em um meio solvente, utilizando heptano. A aplicação deste solvente como meio reacional na síntese enzimática de distintos ésteres de biodiesel, biolubrificantes e ésteres de aroma tem sido bem sucedida e amplamente referida na bibliografia especializada (BASSI et al., 2016; LAGE

et al., 2016; MIRANDA et al., 2014; SILVA et al., 2014; TODERO et al., 2015). Neste estudo, o sistema de reação foi composto por uma fase líquida (solução de substrato) e uma fase sólida (biocatalisador). Assim, a reação cinética pode ser influenciada pelas limitações de difusão das moléculas de substrato em direção à superfície do biocatalisador. De acordo com isso, os testes foram realizados a uma agitação de 240 rpm (TODERO et al., 2015).

5.3 EFEITO DA FONTE DE LIPASE NA SÍNTESE DE ÉSTER

Os três biocatalisadores obtidos na imobilização das enzimas de LTL, LPF e LCR foram utilizados na síntese de palmitato de solketila por esterificação direta de ácido palmítico e solketal em heptano. De acordo como os resultados mostrados na Figura 11, o biocatalisador obtido da imobilização da lipase de *Candida rugosa* (LCR-Octil-SiO_2) foi o biocatalisador mais ativo na síntese de ésteres com uma conversão máxima de 76 ± 2% após 70 min de reação, seguida por LPF (64 ± 1% em 50 min) e LTL (63 ± 2%. após 40 min).

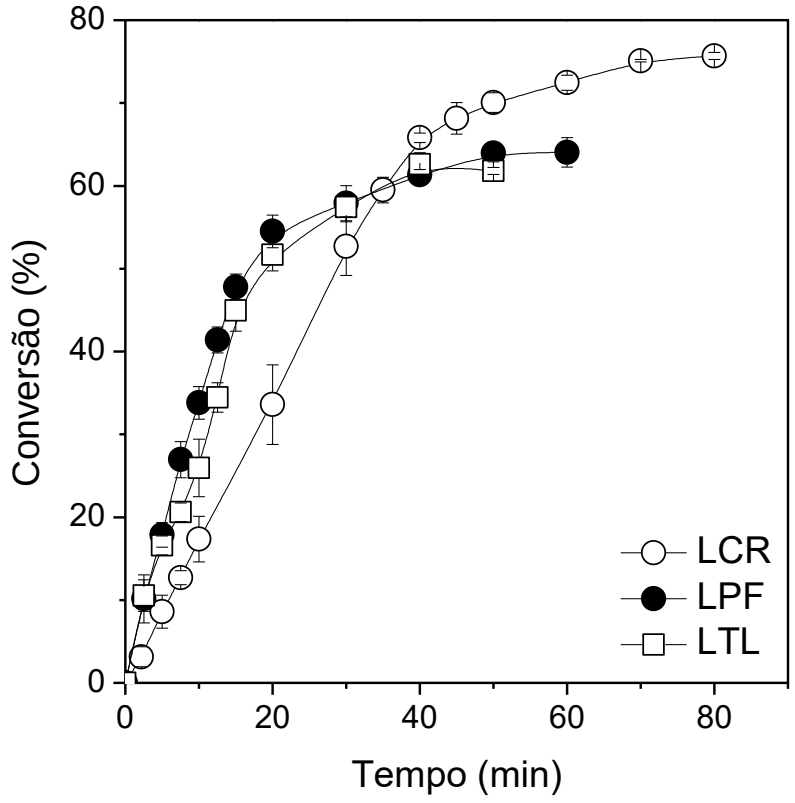


Figura 11 – Efeito da fonte de lipase na síntese de palmitato de solketila

Porém, ainda que a LCR tenha atingido a maior conversão na síntese do éster, este biocatalisador mostrou a menor produtividade na reação (2 mmol/min·g), seguido de LPF (5 mmol/min·g) – Tabela 5. Como pode ser ressaltado, máxima produtividade na reação de esterificação (7 mmol/min·g) foi observada para LTL.

Tabela 5 – Conversão máxima e produtividade na reação de esterificação utilizando os distintos biocatalisadores

Biocatalisador	**Conversão máxima (%)**	**Tempo (min)**	**Produtividade (mmol/min·g)**
LTL	63 ± 2	40	7
LPF	64 ± 1	50	5
LCR	76 ± 2	70	2

A quantidade (massa) do biocatalisador necessário para atingir as 300 U utilizadas na esterificação foi menor para a LTL (0,46 g) seguida por LPF (0,56 g) e LCR (0,94 g). Além disso, o custo de LTL (R$ $6{,}9\times10^{-5}$ por unidade de atividade declarada – U) é relativamente inferior às outras preparações enzimáticas como LPF e LCR, R$ $1{,}3\times10^{-3}$ e R$ $5{,}1\times10^{-2}$ por unidade de atividade declarada (U), respectivamente (SIGMA-ALDRICH, 2020b). É importante salientar que Assim, os testes subsequentes para a otimização dos parâmetros do processo para a síntese do éster foram realizados empregando LTL-Octil-SiO_2 como biocatalisador.

5.4 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA SÍNTESE DE ÉSTER.

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 foi proposto para encontrar as variáveis do processo que têm uma influência significativa na síntese enzimática de palmitato de solketila em termos de percentual de conversão do éster. As reações foram realizadas em um agitador orbital (240 rpm) a 15 min de reação em heptano. Neste ensaio, as variáveis avaliadas foram: temperatura (20 a 60ºC), concentração do biocatalisador (100 a 1500 U) e razão molar de ácido:álcool (1:1 a 1:5). Estes níveis foram escolhidos considerando os limites de operação do aparato experimental empregado e baseado em testes preliminares realizados no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG. As variáveis avaliadas no DCCR foram escolhidas de acordo a sua influência nas reações de esterificação enzimática. A temperatura intervém no equilíbrio de reação, além da estabilidade e a atividade catalítica dos biocatalisadores, assim como nas propriedades reológicas da mistura reacional, principalmente a viscosidade do sistema (GUO; XU, 2006). A concentração de biocatalisador necessária para

atingir o máximo de conversão em uma reação realizada em condições reais é uma variável importante do ponto de vista econômico e industrial (BASSI et al., 2016). Por fim, a razão molar de ácido:álcool foi avaliada, pois a reação de esterificação é reversível e o aumento da concentração de álcool no meio pode resultar em uma conversão em éster, a partir do deslocamento do equilíbrio químico para a obtenção do éster (BASSI et al., 2016; GUO; XU, 2006). Não obstante, a elevada concentração de reagentes ao mesmo tempo pode diminuir a taxa de reação inicial devido à inibição do biocatalisador (KHAN; JADHAV; RATHOD, 2015).

Os valores codificados e reais das variáveis independentes e dependente (conversão) obtidos estão sumarizados na Tabela 6. Como pode ser observado, os valores de conversão experimentais variaram de 9% (ensaio 9) a 85% (ensaio 12) após 15 min de reação. Na Tabela 6 é possível observar também que os desvios entre os valores experimentais e preditos para a variável resposta variam na faixa de 2 (ensaio 15-18) até 18 (ensaio 3). Nos ensaios conduzidos no ponto central (ensaios 15 a 18) identificam-se os menores desvios (≤ 3), demostrando que as faixas selecionadas para estudo estão fixadas em torno do ótimo para conversão. A continuação, são apresentadas as análises que levaram ao modelo de predição.

Tabela 6 – Matriz do delineamento experimental para a análise da influência das variáveis independentes na síntese enzimática de palmitato de solketila por esterificação direta utilizando LTL imobilizada em Octil-SiO_2 como biocatalisador. As reações foram conduzidas em meio heptano (6 mL de mistura reacional com concentração fixa de ácido palmítico – 200 mmol L^{-1}) por 15 min de reação em agitação constante (240 rpm).

Ensaios	**Variáveis independentes (reais)**			**Resposta**		
	Biocatalisador (U)	**Temperatura (°C)**	**Razão molar (ácido:álcool)**	**Conversão (%) Experimental**	**Conversão (%) Predita**	**Desvio (Conversão)**
1	-1 (383)	-1 (28)	-1 (1:1,8)	44 ± 1	34	10
2	+1 (1217)	-1 (28)	-1 (1:1,8)	70 ± 1	60	10
3	-1 (383)	+1 (52)	-1 (1:1,8)	73 ± 1	55	18
4	+1 (1217)	+1 (52)	-1 (1:1,8)	76 ± 1	82	6
5	-1 (383)	-1 (28)	+1 (1:4,2)	27 ± 1	34	7
6	+1 (1217)	-1 (28)	+1 (1:4,2)	56 ± 1	60	4
7	-1 (383)	+1 (52)	+1 (1:4,2)	62 ± 2	55	7
8	+1 (1217)	+1 (52)	+1 (1:4,2)	73 ± 0	82	9
9	-1,68 (100)	0 (40)	0 (1:3)	9 ± 3	23	14
10	+1,68 (1500)	0 (40)	0 (1:3)	76 ± 1	68	8
11	0 (800)	-1,68 (20)	0 (1:3)	50 ± 2	56	6
12	0 (800)	+1,68 (60)	0 (1:3)	85 ± 1	92	7
13	0 (800)	0 (40)	-1,68 (1:1)	44 ± 1	56	12
14	0 (800)	0 (40)	+1,68 (1:5)	61 ± 1	56	5
15	0 (800)	0 (40)	0 (1:3)	76 ± 0	74	2
16	0 (800)	0 (40)	0 (1:3)	76 ± 0	74	2
17	0 (800)	0 (40)	0 (1:3)	77 ± 0	74	3
18	0 (800)	0 (40)	0 (1:3)	76 ± 1	74	2

Os valores experimentais e preditos para a conversão (variável resposta) foram muito similares, mostrando que este modelo pode ser usado com sucesso para descrever a relação entre as variáveis independentes e a resposta. Utilizando os dados experimentais apresentados na Tabela 6 e o software Statistica, foi possível avaliar o efeito da variação dos parâmetros investigados na conversão de ésteres, conforme mostra o diagrama de Pareto (Figura 12). O diagrama de Pareto é uma ferramenta estatística útil para visualizar e identificar as variáveis significativas e não significativas para uma análise.

Considerando o nível de confiança de 95%, pode-se ver que os efeitos lineares e quadráticos para a variável concentração de biocatalisador (x_1 e x_1^2) e o efeito linear para temperatura (x_2) foram significativos para explicar os valores de conversão a partir das mudanças nestes parâmetros. Apesar do parâmetro razão molar (x_3^2) não ter sido significativo estatisticamente, este foi considerado na descrição do modelo, pois sabe-se que a razão molar para as reações de esterificação, é importante para definir o equilíbrio da reação e consequentemente o rendimento, além de influenciar na solubilidade e reologia do sistema reacional. Assim pode se dizer, que a utilização de um modelo estatístico ajuda a predizer as variáveis que influenciam no comportamento de um sistema, porém alguns parâmetros podem influenciar no desenvolvimento real do processo no laboratório, ainda que não se mostrem estatisticamente significativos na teoria e devem ser considerados.

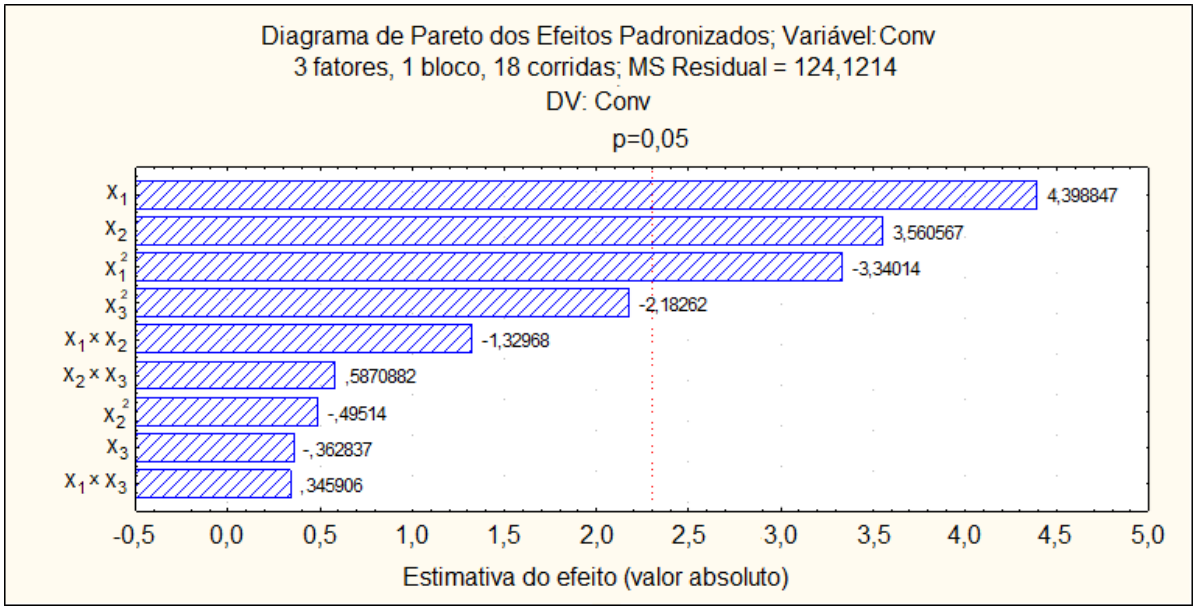


Figura 12 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados da variável resposta.
Em que: x_1, x_2 e x_3, representam as variáveis de concentração de biocatalisador, temperatura de reação, e razão molar ácido:álcool, respectivamente.

Desta forma, a regressão a ser validada estatisticamente pela ANOVA levou em consideração apenas os parâmetros do modelo empírico que foram significativos em 95% de confiança, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 – Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de *p* para os parâmetros significativos na síntese enzimática de palmitato de solketila**.**

Parâmetro	Coeficiente de regressão	Erro padrão	*p*
Média	74,4	± 0,2	3,5 x 10^{-8a}
x_1	13,3	± 0,1	1,9 x 10^{-6a}
x_1^2	-10,1	± 0,1	4,5 x 10^{-6a}
x_2	10,7	± 0,1	3,6 x 10^{-6a}
x_3^2	-6,5	± 0,1	1,7 x 10^{-5a}

x_1, x_2, e x_3 representam as variáveis de concentração de biocatalisador, temperatura de reação, e razão molar ácido:álcool, respectivamente.
a: parâmetros significativos a 95% do nível de confiança

Os coeficientes de regressão para os parâmetros significativos reportados na Tabela 7 foram utilizados para expressar o efeito de cada variável na porcentagem de conversão (resposta), resultando em um modelo polinomial empírico de segunda ordem, considerando os valores codificados das variáveis significativos. Este modelo é mostrado na Eq. (7).

$$Y(\%) = 74{,}4 + 13{,}3x_1 - 10{,}1{x_1}^2 + 10{,}7x_2 - 6{,}5{x_3}^2 \qquad (7)$$

Em que: Y é a porcentagem de conversão do éster, $x_1, x_2\ e\ x_3$ representam os valores codificados para concentração do biocatalisador, temperatura de reação e razão molar (ácido:álcool), respectivamente.

Nota-se a partir da equação 7, que o parâmetro concentração de biocatalisador possui leve influência positiva para maximizar a conversão do éster, considerando os parâmetros linear e quadrático do modelo, principalmente nas condições próximas ao ponto central. No entanto, a temperatura de reação apresenta forte influência positiva para maximizar a conversão, principalmente em condições acima do ponto central. Por sua vez, a razão molar apresenta leve influência negativa na maximização da conversão, principalmente quando fora do ponto central.

O ANOVA da regressão (Tabela 8), revela que o modelo empírico obtido é uma representação adequada da relação efetiva entre a resposta (conversão) e os parâmetros de reação significantes, uma vez que pelo teste F de Fisher o valor F calculado para a regressão (13,93) foi quatro vezes maior do que o valor F tabelado, a um nível de significância de 5% ($F_{0,05;4;13}$=3,18). O valor de R^2 é de 0,81, considerado apropriado para descrever um bom comportamento do processo, uma vez que os R^2 superiores a 0,80 são considerados aceitáveis,

uma vez que oferecem um modelo adequado aos dados experimentais (SCHIRMANN et al., 2018). O erro puro foi muito baixo (0,66), indicando boa reprodutibilidade dos dados obtidos. Isso indica que o modelo matemático dado pela Eq. (7) é estatisticamente significante e adequado para representar a relação entre as variáveis dependentes e independentes, nas faixas investigadas. Assim, baseado em estes resultados, este modelo também pode ser utilizado com sucesso para criar e explorar as superfícies de resposta (RSM) com o objetivo de encontrar as condições experimentais ótimas que maximizem a síntese enzimática do palmitato de solketila.

Tabela 8 – Analise de variância (ANOVA)

Fonte de variação	**Soma dos quadrados**	**Grau de liberdade**	**Media quadrática**	**Teste - F**
Regressão	5644,4	4	1411,1	13,93
Residual	1316,8	13	101,3	
Falta de Ajuste	1316,17			
Erro Puro	0,66			
Total	6961,2	17		

R^2=0,81; $F_{0,05;4;13}$=3,18

A partir do modelo empírico validado estatisticamente, o efeito da interação dos parâmetros avaliados na síntese do éster foi estudado pelo gráfico das curvas de superfície de resposta (RSM) geradas usando o software Statistica versão 5.0. Os gráficos de superfície de resposta e de contorno das combinações binárias entre concentração do biocatalisador x temperatura, concentração do biocatalisador x razão molar ácido:álcool e temperatura x razão molar ácido:álcool, são mostradas nas Figuras 13A e 14A, 13B e 14B e 13C e 14C, respectivamente. Estas representações forneceram informações sobre como a variação dos diferentes parâmetros e suas interações, influenciam na maximização da resposta, conversão de éster, desta forma é possível identificar a região ou o ponto ótimo para as variáveis do processo de forma a obter a conversão máxima.

De acordo com as Figuras 13A e 14A (combinação binária entre temperatura de reação e concentração de biocatalisador), pode ser observada uma influência significante da concentração do biocatalisador na porcentagem de conversão. Nota-se que o aumento gradual da porcentagem de conversão foi de 9 para 77% após 15 min de reação, quando o aumento da concentração do biocatalisador foi de 100 U para 800 U (de 2,5% a 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação), fixando-se as condições de temperatura (40°C) e razão molar acido:álcool (1:3). A maior porcentagem de éster (85%) foi obtida no ponto central (800 U) para esta variável de processo. Isso acontece devido ao aumento do número de sítios

ativos disponíveis para catalisar a esterificação no sistema de reação. Porém, um possível efeito negativo sob as propriedades reológicas e a transferência de massa na mistura reacional podem ser acreditadas ao emprego de altas concentrações de biocatalisador (>1200 U), de acordo com o observado nas Figuras 13A e 14A. Para o teste realizado com 1500 U – ou 38% em massa do biocatalisador por volume de meio de reação, uma porcentagem de conversão de 76% foi obtida, similar à conversão atingida empregando menor quantidade do biocatalisador (800 U – ou 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação) nas mesmas condições (40°C e razão molar de 1:3 ácido:álcool). A adição de uma quantidade maior de biocatalisador pode acarretar problemas de difusão devido ao aumento da capacidade de adsorção do meio de reação em seu microambiente que impacta negativamente na reologia do meio. Industrialmente, é desejável empregar-se a menor quantidade possível de catalisador, configurando economia em insumos no processo.

Por outro lado, o efeito da temperatura na maximização da síntese do éster também possui um papel importante na porcentagem de conversão, melhores resultados foram obtidos para valores em torno de 56 – 60°C, podendo estar relacionada com a estabilidade da enzima imobilizada e as características favoráveis da mistura reacional (reológicas e solubilidade). Os resultados sugerem que um aumento na temperatura diminui a viscosidade da mistura, melhorando as propriedades reológicas do meio de reação, o que influencia fortemente na transferência de massa dos reagentes até os sítios ativos da enzima. Efeitos similares foram observados por Guo e Xu (2006) demonstrando a influência da temperatura na estabilidade reológica da mistura reacional (GUO; XU, 2006).

Desta forma, o emprego de temperaturas acima de 40°C, é capaz de aumentar a conversão de 50% (ensaio 11 – 20°C) para 85% (ensaio 12 – 60ºC), nas mesmas condições de razão molar (1:3) e concentração do biocatalisador (800 U – 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação). Ainda que as variáveis temperatura e concentração de biocatalisador demostraram efeitos significativos na conversão de éster, sua interação não foi significativa ao nível de confiança de 95%.

A combinação binária dos efeitos das variáveis razão molar de ácido:álcool e biocatalisador, sobre a conversão de éster, é mostrada nas Figuras 13B e 14B. Reações de esterificação são processos reversíveis e o excesso de álcool na mistura reacional pode deslocar o equilíbrio para a direção da produção de ésteres (LAGE et al., 2016). Nota-se na proporção de 1:3 que a máxima conversão em éster foi obtida (85%) para as melhores condições de concentração de biocatalisador (800 U) e temperatura de 60°C. Desta forma, o emprego de excesso de álcool (solketal) na mistura reacional, contribui para o deslocamento do equilíbrio

de reação, resultando em maior conversão (GUO; XU, 2006; BASSI et al., 2016). Contudo, um aumento além do valor de razão 1:3 não resulta em ganho adicional para a conversão, uma vez que, em concentrações maiores de álcool, pode haver influência sobre as características do meio reacional, ou bem, este produzir efeitos nocivos no biocatalisador distorcendo a enzima produzindo a sua inativação, ou simplesmente atuando como inibidor (ALVES; CREN; MENDES, 2016; BADGUJAR; BHANAGE, 2015). Do mesmo modo, a Figura 13B confirma, de acordo com o ilustrado na Figura 14A, que o valor ótimo de concentração do biocatalisador é próximo ao ponto central (800 U – ou 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação). A interação entre razão molar e concentração de biocatalisador, também não foi significativa a um nível de confiança de 95%.

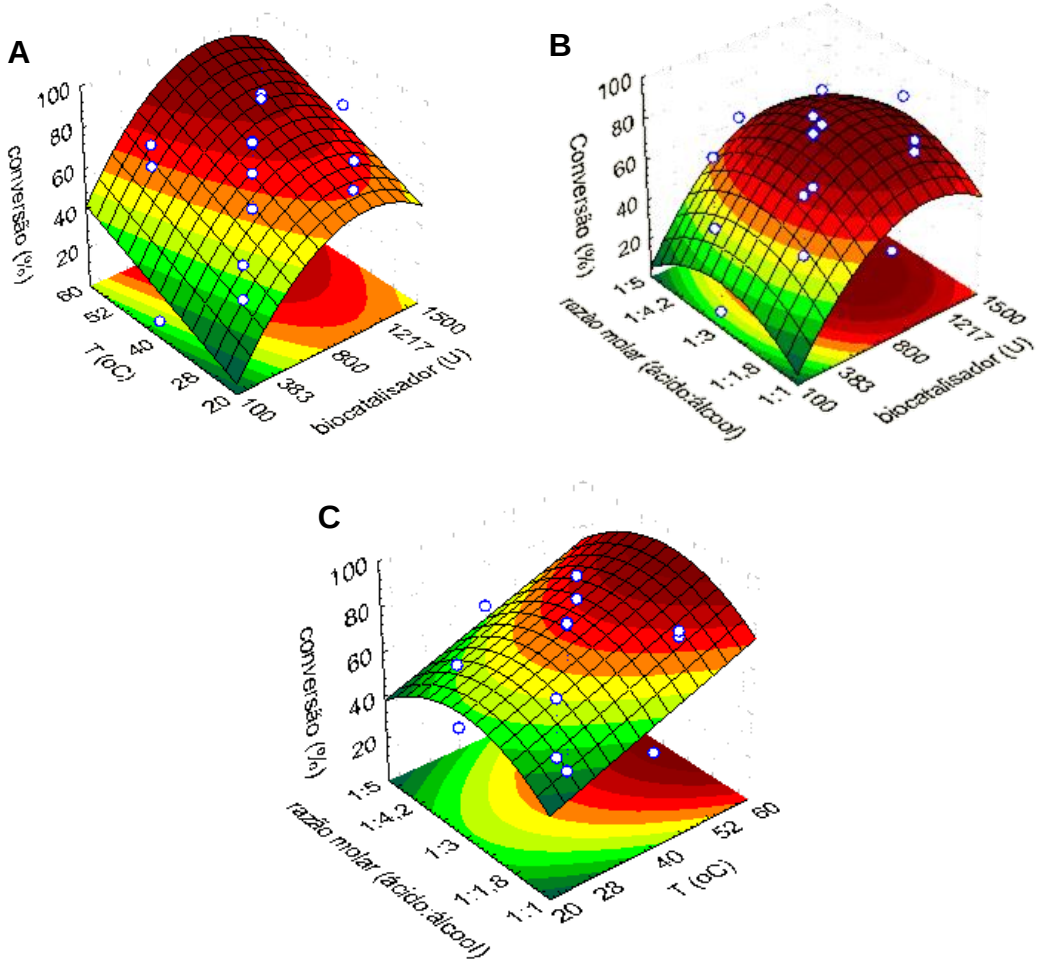


Figura 13 – Superfícies de reposta de acordo com o modelo quadrático predito para a síntese enzimática de palmitato de solketila. Efeito da temperatura e concentração do biocatalisador (A), efeito da razão molar ácido:álcool e concentração do biocatalisador (B) e efeito da razão molar ácido:álcool e temperatura (C) na porcentagem de conversão em éster.
Fonte: Do autor

Por fim, as Figuras 13C e 14C representam a influência da razão molar de ácido:álcool e temperatura na conversão do éster. O gráfico confirma (em acordo com as Figuras 13A-B and 14A-B) que as melhores condições para a razão molar ficam em torno do ponto central (1:1,8 e 1:4,2) em condições de temperatura acima de 55°C (entre 56 e 60°C) e concentração de biocatalisador de 800U ou 20% em massa de biocatalisador por volume de meio de reação, quando a conversão atinge 85,0%. O efeito da interação entre estas duas variáveis (razão molar e temperatura de reação) não é significativo a um nível de confiança de 95%.

Com a finalidade de confirmar as regiões ótimas e determinar os pontos ótimos dentro destas faixas, foram propostos e realizados seis experimentos adicionais conforme mostrado na Tabela 9. Assim, a síntese enzimática do éster foi estudada sob as faixas de condições consideradas ótimas para maximizar a conversão. Ou seja, em torno do ponto central para concentração do biocatalisador e razão molar ácido:álcool e acima do ponto central para a temperatura.

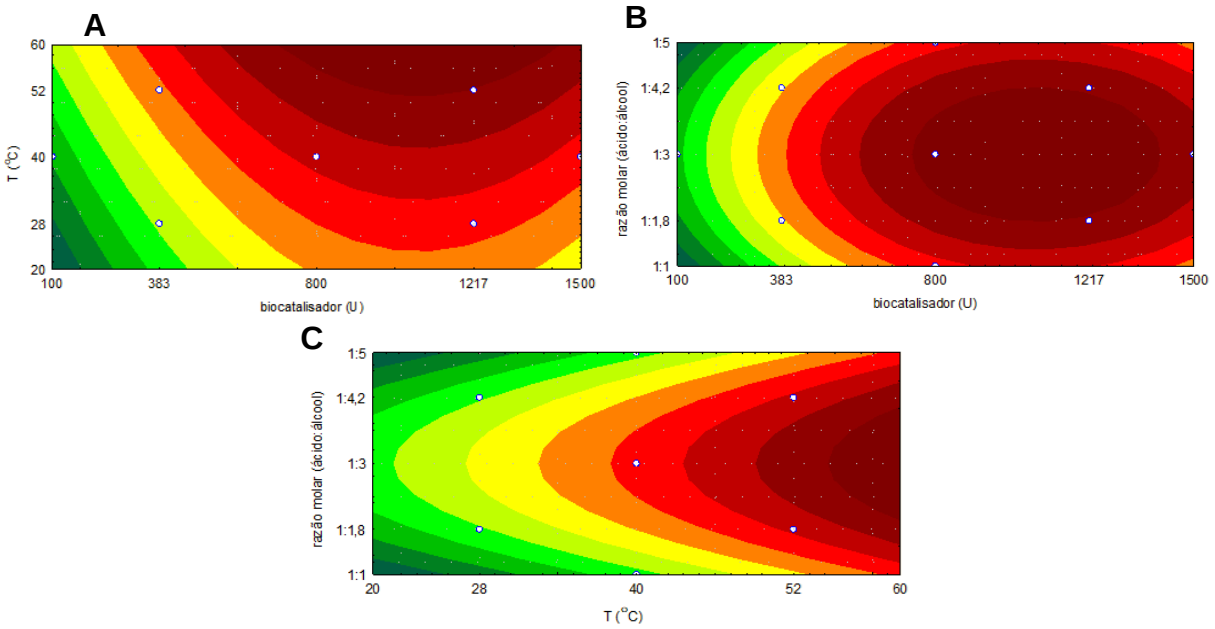


Figura 14 - Gráficos de contorno obtidos de acordo com o modelo quadrático predito para a síntese enzimática de palmitato de solketila. Efeito da temperatura e concentração do biocatalisador (A), efeito da razão molar ácido:álcool e concentração do biocatalisador (B) e efeito da razão molar ácido:álcool e temperatura (C) na porcentagem de conversão em éster.

Estes experimentos, corroboram que os efeitos são interativos, não podendo ser analisados isoladamente, pois interferem entre eles e no resultado final, por isso, um grande efeito da temperatura é observado quando a razão molar é menor, ou seja, um incremento da temperatura melhora os resultados utilizando uma razão molar mais baixa. Assim mesmo,

confirmam a importância de considerar o efeito da razão molar (acido:álcool) na otimização do sistema, ainda que não tenha sido significativo estatisticamente este parâmetro dentro da faixa investigada. Contudo, ele demonstrou influenciar a reologia do sistema afetando diretamente a porcentagem de conversão em éster.

Nas condições, concentração do biocatalisador de 800 U (valor codificado = 0 – PC), temperatura de 56°C (valor codificado = +1,34 – acima do PC) e razão molar ácido:álcool de 1:3 (valor codificado = 0 – PC), a porcentagem de conversão máxima de éster (experimental) foi de 84% após 15 min de reação – experimento no.5 (Tabela 9), valor considerado igual ao obtido para o experimento 6 (84%), quando maior temperatura é utilizada (60°C – valor codificado = +1,68).

Tabela 9 – Testes de esterificação nas melhores condições reacionais baseadas na análise de superfície de resposta.

Ensaio	Biocatalisador (U)	Temperatura (°C)	Razão molar (ácido:álcool)	Y_{real} (%)	Y_{teor}[a] (%)	Desvio de Y_{rea} e Y_{teor}
1	+0,24 (900)	+1,34 (56)	0 (1:3)	79 ± 1	91	12
2	+0,24 (900)	+1,34 (56)	–1 (1:1)	54 ± 2	85	31
3	+0,24 (900)	+1,68 (60)	0 (1:3)	81 ± 1	95	14
4	+0,24 (900)	+1,68 (60)	–1 (1:1)	57 ± 2	89	32
5	+0 (800)	+1,34 (56)	0 (1:3)	84 ± 1	89	5
6[b]	+0 (800)	+1,68 (60)	0 (1:3)	84 ± 1	92	8

a: valores calculados utilizando os coeficientes de regressão e respectivos valores das variáveis codificadas sumarizados na Tabela 7.
b: Dados experimentais obtidos no ensaio # 12 reportado na Tabela 6.

Os níveis selecionados de cada variável foram limitantes porque as melhores condições experimentais foram encontradas nos pontos centrais (PC) de concentração do biocatalisador e razão molar ácido:álcool (valores codificados = 0) e cerca do ponto máximo de temperatura (valor codificado = +1,34).

Do ponto de vista industrial, o emprego de quantidades mínimas de insumo são desejáveis economicamente, logo, se é possível conciliar máxima conversão com mínimo de insumos, o processo pode tornar-se mais atrativo. Portanto, como observado na Tabela 9, uma pequena redução na quantidade de biocatalisador de 100 U (de 900 a 800 U) e na temperatura de 4 ºC (de 60 a 56 ºC) não teve um efeito negativo significante na reação, assim as condições do experimento 5 mostram-se atrativas industrialmente e foram selecionadas como ótimas.

Neste estudo, a otimização dos parâmetros de processo foi satisfatória, devido a que, para a concentração de biocatalisador, foi definida a quantidade limite (800 U) que maximiza a conversão nas condições estudadas. Além disso, a temperatura selecionada (56°C) a partir dos ensaios, não é drástica, já que fica abaixo dos 60°C, mas melhora as condições reológicas do

meio reacional, diminuindo a viscosidade do mesmo e melhorando a solubilidade do ácido palmítico, evitando a separação de fases, e ao mesmo tempo, é uma temperatura compatível com a enzima LTL. Embora a razão molar influencie a cinética da reação e o equilíbrio, existem limites consistentes em termos de desperdício de reagentes e custos de instalação e operação. Portanto, conforme observado, também foi estabelecido um ótimo para esse parâmetro que determina uma proporção razoável (razão molar ácido:álcool de 1:3) para que a conversão seja maximizada.

Pode-se dizer que valores muito menores para a razão molar influenciam negativamente no processo, pois pode ocorrer uma possível separação de fases (solubilidade dos reagentes) e aumento da viscosidade. Estes efeitos negativos podem ser agravados com a redução da temperatura de processo. Assim, é possível supor que a temperatura possui um efeito determinante para o bom sucesso do processo, pois interfere na ação da enzima, além de influenciar nas características do meio (reologia e solubilidade dos reagentes). Deste modo, pode-se estabelecer, que as melhores condições para a síntese do éster foram temperatura de 56ºC, concentração do biocatalisador de 800 U – ou 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação e razão molar ácido:álcool de 1:3. Assim, testes subsequentes foram realizados empregando estas condições dos parâmetros de processo.

5.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA PENEIRA MOLECULAR NA SÍNTESE

Nas reações de esterificação, um dos produtos gerados é água. A sua acumulação no meio de reação e no microambiente do biocatalisador afeta drasticamente a síntese de ésteres (PALUDO et al., 2015). Sendo assim, é comum adotar estratégias de controle da concentração ou remoção de água no meio de reação, incluindo a utilização de agentes desidratantes como peneiras moleculares, podendo reduzir a possível hidrólise do éster produzido e, consequentemente, deslocando o equilíbrio da reação para a formação de produto (MACHADO et al., 2019; MIRANDA et al., 2014).

O efeito da concentração da peneira molecular, na faixa de 0 a 20% m/v de meio reacional na síntese do éster foi testado. De acordo com a Figura 15, nenhuma influência da concentração da peneira molecular foi observada. Pode-se dizer que para qualquer um dos casos nessa faixa de concentração de peneira (0-20% m/v), a máxima conversão de éster de 84% foi atingida após 150 min de reação.

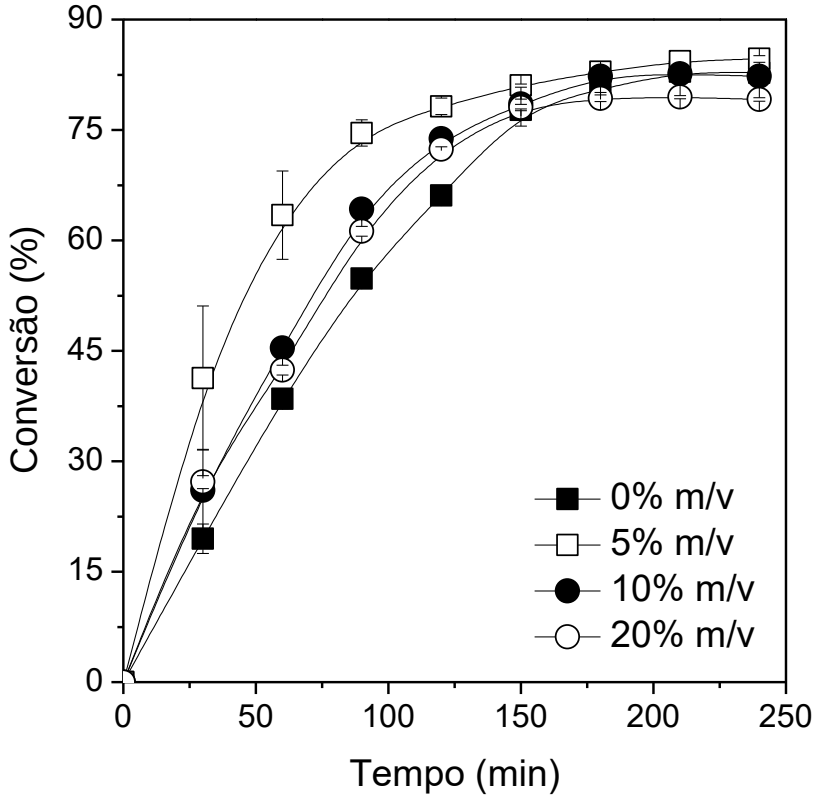


Figura 15 – Efeito da concentração de peneira molecular na síntese de palmitato de solketila

Ainda quando a adição de 5% m/v de peneira molecular acelerou a velocidade inicial da reação nos primeiros 120 min de reação, após 150 min de reação é observada similar conversão (equilíbrio) em todas as condições, tornando a adição de peneira um processo desnecessário. Assim, a ausência de peneira gera economia quanto ao uso de insumo e maior facilidade de separação do biocatalisador heterogêneo.

Estes resultados sugerem que sob essas condições as moléculas de água geradas durante a reação de esterificação foram adsorvidas na superfície do biocatalisador para manter a estrutura tridimensional da enzima ativa (MIRANDA et al., 2014). As enzimas precisam de uma certa quantidade de água para preservar sua integridade estrutural, principalmente do seu sítio catalítico, o qual é vital para o processo de catálise (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Sendo assim, peneiras moleculares não foram utilizadas em testes subsequentes.

5.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE REAGENTES NA SÍNTESE DO ÉSTER

O incremento na produtividade volumétrica – razão entre a quantidade de éster e o volume do reator, facilita a separação e purificação do produto (ALVES; CREN; MENDES, 2016; BASSI et al., 2016; LAGE et al., 2016). Por isso, o efeito da concentração de reagentes na síntese do éster também foi avaliado. Neste conjunto de experimentos, a reação foi realizada utilizando uma razão molar ácido:álcool variando de 200:600 a 1000:3000 mM em meio heptano, enquanto um ensaio livre de solvente também foi analisado na conversão do éster. Nestas condições, de acordo a Figura 16 a conversão do éster para os quatro experimentos realizados em meio solvente mostrou conversões similares variando de 78 a 85% em diferentes tempos de reação.

A esterificação conduzida na menor concentração de reagentes (maior volume de solvente) – 0,2 mol/L de ácido palmítico apresentou a maior porcentagem de conversão (da ordem de 85% – 170 mM de ácido convertido). Nestas condições, o equilíbrio da reação foi observado após 20 min de reação. Por outro lado, na reação com maior concentração de reagentes (1000:3000 mM) foi atingida uma conversão percentual de aproximadamente 83% após 150 min de reação (830.mM de ácido convertido).

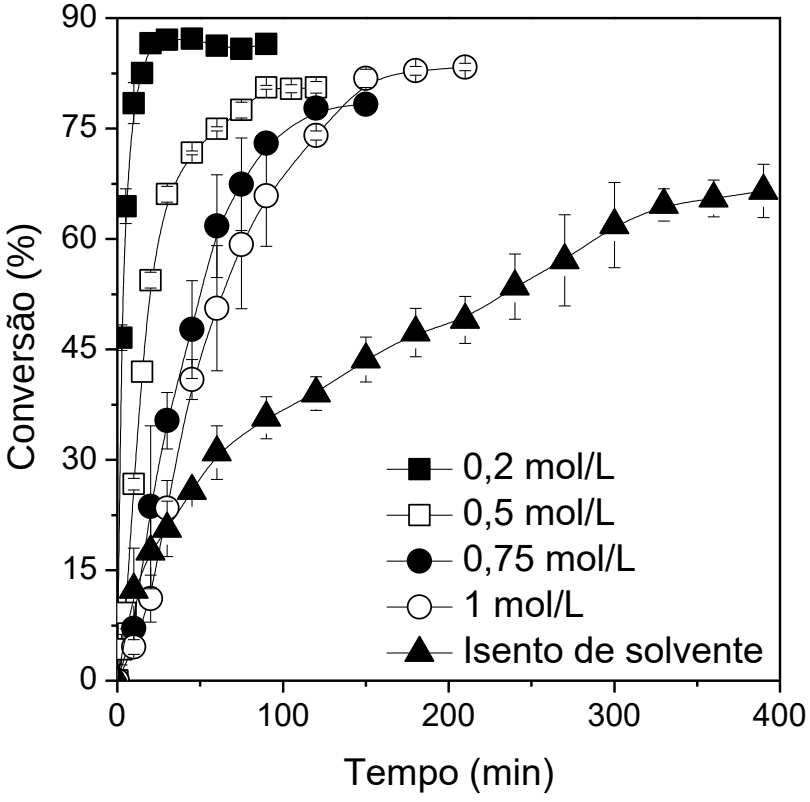


Figura 16 - Efeito da concentração de reagentes na síntese de palmitato de solketila

Uma maior porcentagem de conversão foi observada utilizando uma concentração menor de reagentes (200:600 mM). Porém, o volume de heptano utilizado, quando comparado com a reação com maior concentração de reagentes, acarreta maior desperdício de solvente, dificuldade na separação de produtos, menor volume útil do reator e menor produtividade na reação (necessidade de mais bateladas – 5x para obter similar massa de produto se comparado com reações em meios com maior concentração de reagentes). Assim, é interessante do ponto de vista industrial a utilização de meios reacionais com uma maior concentração inicial de reagentes, pois uma maior quantidade do produto pode ser obtida em um menor número de bateladas, porém um tempo maior de reação é necessária (150 min).

Do ponto de vista industrial, reações de esterificação conduzidas empregando baixas quantidades de solvente (ou sistemas isentos de solvente) têm várias vantagens, incluindo maior produtividade volumétrica e a possibilidade de que os reagentes remanescentes possam ser facilmente separados dos produtos e prontamente reciclados. Porém, no experimento realizado no sistema isento de solvente foi atingida uma menor porcentagem de conversão em éster (66%) após 390 min. Este valor é bastante inferior àqueles valores alcançados para sistemas reacionais em heptano. Como esperado, na presença de solventes ocorre uma melhor difusão das moléculas de reagentes para o microambiente do biocatalisador. Deste modo, as características do meio reacional são alteradas em termos de solubilidade e viscosidade. Na presença de solvente orgânico no meio de reação, é observada uma diminuição da viscosidade na mistura de reação que facilita a transferência de massa (BASSI et al., 2016). Os resultados mostram que o uso de um solvente hidrofóbico como meio reacional reduziu a viscosidade do sistema, o qual melhora a difusão dos componentes para os sítios ativos da LTL imobilizada (ALVES et al., 2016; LIMA et al., 2018). Assim, testes subsequentes foram realizados utilizando uma concentração de reagentes de 1000:3000 mM de ácido:álcool.

5.7 EFEITO DO TEMPO DE REAÇÃO NA SÍNTESE DO ÉSTER

Neste estudo, o efeito do tempo de reação na síntese do éster foi realizada nas condições otimizadas definidas a partir do estudo de otimização de parâmetros apresentado anteriormente (56 ºC, concentração do biocatalisador 800 U – 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação, razão molar ácido:álcool 1:3 com concentração de 1000 mM para o ácido palmítico, 240 rpm e ausência de peneira molecular). Baseado nos resultados

obtidos na Figura 16, a porcentagem de conversão em éster foi de 83% após 150 min de reação. Estas condições experimentais foram estabelecidas em testes de reúso.

5.8 TESTES DE REÚSO DO BIOCATALISADOR

O reúso de biocatalisadores heterogêneos (lipases imobilizadas) é um dos fatores mais importante para suas aplicações, principalmente em escala industrial (ALVES et al., 2016; LIMA et al., 2018). Neste estudo, os testes de reúso foram realizados utilizando como biocatalisador LTL imobilizada em Octil-SiO_2 na síntese do éster palmitato de solketila nas condições ótimas de reação previamente estabelecidas – 56°C, 800 U – 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação, 240 rpm e razão molar ácido:álcool 1:3 (com concentração de ácido palmítico de 1000 mM) em meio heptano e na ausência de peneira molecular. Um total de 7 sucessivos ensaios foram conduzidos, cada um com um tempo de 150 min. Os dados de conversão obtidos em cada ciclo de reação, em modo batelada, estão ilustrados na Figura 17.

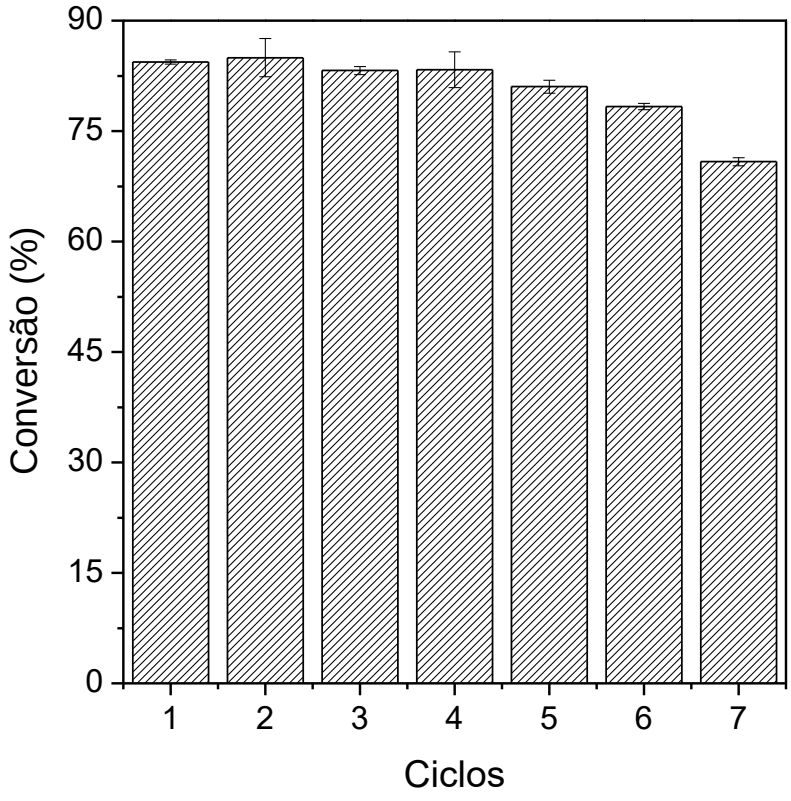


Figura 17 -Testes de reúso do biocatalisador após sucessivos ciclos de reação de síntese de palmitato de solketila.

De acordo com os resultados apresentados, o biocatalisador preparado reteve a sua atividade original até o 5º ciclo. Após, foi observado um ligeiro decréscimo de atividade e após o 7º ciclo de reação foi observada uma atividade da ordem de 87% da atividade original. Estes resultados podem ser atribuídos a uma possível inativação da enzima por influência da temperatura de reação ou à acumulação de moléculas de água (subproduto da esterificação) ou de solketal no microambiente do biocatalisador, causando a dessorção da enzima ou criando uma camada hidrolítica que restringe a partição das moléculas de ácido palmítico ao seu microambiente (MACHADO et al., 2019; MOTEVALIZADEH et al., 2015; PÁEZ et al., 2003; SILVA et al., 2014). Embora tenha sido observado um decréscimo de atividade catalítica após sete ciclos de reação, o biocatalisador preparado mostrou ser altamente ativo e estável após 7 sucessivos ciclos de reação em modo batelada.

5.9 LEVANTAMENTO DA LITERATRURA E COMPARAÇÃO COM O PRESENTE ESTUDO

Com a finalidade de colocar os resultados obtidos da otimização da reação de esterificação em perspectiva adequada, uma comparação com estudos anteriores sobre a produção de ésteres (MG) a partir de ácido palmítico pode ser interessante. Kwon et al. (1995) relataram que uma conversão total de 81,4% (61% MG e 11% DG) de glicerídeos de ácido palmítico foi obtida com o preparo comercial de *Rhizopus delemar* em 48 h, baixo as condições de temperatura de 25°C e razão molar de 1:5 glicerol:ácido em meio hexano (KWON; HAN; RHEE, 1995). Freitas et al. (2010) analisaram a obtenção de 55,76% de conversão total (46% de MG + 6% de DG + 4% de TG) com lipase de *Penicillium camembertii* (imobilizada em resina de epóxi-SiO_2-PVA), nas condições reacionais razão molar glicerol:ácido palmitico (8:1), meio isento de solvente, 45-65°C, 200 rpm, 6 h e 5% p/p de biocatalisador (FREITAS et al., 2010). Em um estudo recente, Kapoor e Gupta (2012) obtiveram uma porcentagem relativamente maior de conversão de 85-90% (81-87% de MG de ácido palmitico) com as preparações reticuladas de *Candida antartica* B (CLEAs. PCMCs e CLPMC, obtendo conversões máximas de 85, 86 e 90% respectivamente), nas condições operacionais de razão molar ácido:álcool de 1:4, temperatura de 50°C, 300 rpm e 1 g de biocatalisador após 24 h de reação (KAPOOR; GUPTA, 2012).

Com base em isso, pode-se dizer que os resultados indicam que é possível obter uma alta taxa de conversão (83%) na sínteses enzimática por esterificação de ácido palmítico e solketal (palmitato de solketila) usando o biocatalisador derivado LTL-Octil-SiO_2 nas condições optimizadas de concentração do biocatalisador de 800 U ou 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação, razão molar de ácido:álcool de 1:3 usando uma concentração inicial de 1 mol L^{-1} para o ácido palmítico em meio heptano, após 150 min de incubação a 56°C, 240 rpm e ausência de peneira molecular. Mostrando ser um biocatalisador heterogêneo altamente ativo em reações de esterificação em meio orgânico. Além disso, o biocatalisador produzido pode ser utilizado por até 7 ciclos consecutivos mantendo 87% da sua atividade original.

5.10 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÉSTER

No presente estudo, cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para identificar o produto formado na síntese enzimática do éster de ácido palmítico e solketal. Na Figura 18A está ilustrada a análise em placa de CCD para os reagentes (ácido palmítico –Ac e solketal -A) e as frações sólida (E1) e líquida (E2) do produto obtido. De acordo com essa figura, é possível concluir que o éster produzido se encontra na fração líquida do produto.

Uma vez identificada a fração que apresenta o éster, este foi isolado por cromatografia em coluna (cartucho). Como mostrado na Figura 18B, o éster foi separado e concentrado nas frações 8-12. Uma vez apartado o produto e evaporado o solvente residual, o éster obtido foi caracterizado por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C e testes de atividade antimicrobiana (placa MIC) no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL.

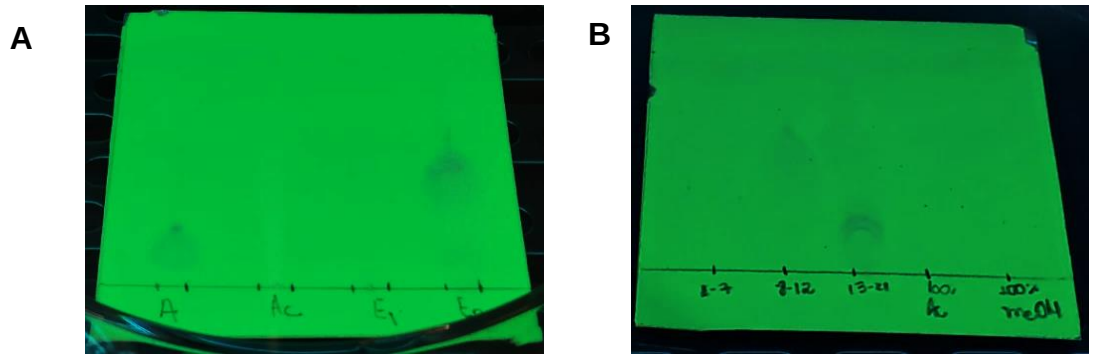


Figura 18 – (A) – CCD dos reagentes: solketal (A), ácido palmítico (Ac), e das frações sólidas (E1) e líquida (E2) do produto obtido. (B) – CCD das frações obtidas da separação por cartucho de sílica. Na faixa de frações 8-12 foi separado o éster e na faixa 13-21 é observado o solketal remanescente

5.11 CARACTERIZAÇÃO DO ÉSTER PRODUZIDO

5.11.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) - Éster

O éster purificado é um líquido transparente e altamente viscoso e sua fórmula molecular é $C_{22}H_{42}O_4$ (MM = 310 g/mol). A síntese do palmitato de solketila foi confirmada por RMN de ^{1}H e ^{13}C, e suas atribuições foram feitas com auxílio de experimentos bidimensionais. A numeração dos átomos do palmitato de solketila é representado na Figura 19.

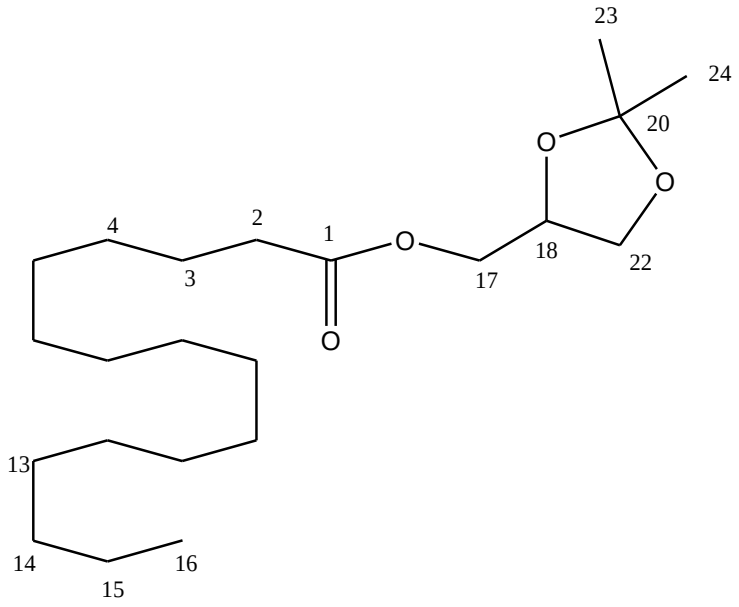


Figura 19 – Estrutura do éster purificado – Palmitato de solketila

De acordo com a análise dos dados de RMN (Tabela 10), os espectros DEPT-135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) do éster mostraram sinais de carbono (RMN de ^{13}C) correspondentes a três grupos metil C-16, C23 * e C24 * (δ_C 14,2, 26,7 e 25,4, respectivamente), treze metilenos C-2, C-3, C4-C13, C-14 e C-15 (δ_C 34,1, 24,9, 29,1-29,7 e 22,7, respectivamente), e dois metilenos oxigenados C-17 e C-22 a 64,5 e 66,3 ppm, um metino oxigenado C-18 (δ_C 73,7) e dois carbonos quaternários, C-1 um grupo carbonila (δ_C 173,8) e C-20 um carbono sp^3 (δ_C 109,8). O RMN de ^{1}H - do éster exibiu sinais atribuídos a três grupos metil a δH 0,87 (3H, t, J=6 Hz, H-16), 1,37 (3H, s, H-24) e 1,43 (3H, s, H-23), dois metileno oxigenado a δH 4,09 e 4,11 (2H, m, H-17) e a δH 3,71 e 4,05 (2H,

m, H-22), um metino oxigenado a δH 4,32 (1H, m, H-18) e catorze grupos metileno em δH 2,34 (2H, t, J= 6,0 Hz, H-2), 1,25 (2H, m, H-14), 1,62 (2H, m, H-3), 1,25 (2H, m, H-15), 1,25 (20H, m, H4-H14)

O deslocamento observado no RMN de ^{13}C em δC 173,8 corresponde ao grupo carbonila [–CH_2(C=O)OCH_2–] da estrutura do éster. Para o RMN de ^{1}H, são observados picos específicos em δH 2,34, para o grupo metileno ligado ao grupo carbonila da porção éster [–CH_2(C=O)OCH_2–], e em δH 4,09 e 4,11 para o grupo metileno ligado ao átomo de oxigênio [–CH_2(C=O)OCH_2–] (LAGE et al., 2016; TODERO et al., 2015).

Tabela 10 – Deslocamento químico e atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C e ^{1}H do palmitato de solketila.

Posição	δ^{13}C ($CDCl_3$)	δ^{1}H (m, J - Hz) ($CDCl^3$)	HMBC
1	173,8 (C=O)	-	4,09; 4,11; 2,34; 1,62
20	109,8 (C)	-	3,71; 4,05; 4,09; 1,37; 1,43
18	73,7 (CH)	4,32 (m)	3,71; 4,09; 4,11
22	66,3 (CH2)	3,71; 4,05	4,09; 4,15
17	64,5 (CH2)	4,11; 4,09 (m)	3,71; 4,09; 4,11
2	34,1 (CH2)	2,34 (t, 6)	1,62
14	31,9 (CH2)	1,25 (m)	1,25; 0,87
	29,7 (CH2)	1,25 (m)	1,25; 2,34
	29,6 (CH2)	1,25 (m)	
	29,5 (CH2)	1,25 (m)	
	29,4 (CH2)	1,25 (m)	
	29,3 (CH2)	1,25 (m)	
	29,1 (CH2)	1,25 (m)	
23	26,7 (CH3)	1,43 (s)	1,37
24	25,4 (CH3)	1,37 (s)	1,43
3	24,9 (CH2)	1,62 (q)	2,34
15	22,7 (CH2)	1,25 (m)	0,87; 1,25
16	14,2 (CH3)	0,87 (t, 6)	1,25

a: Multiplicidade: s= simpleto; d= dupleto; t = tripleto; q= quarteto; m = multipleto

As correlações de HMBC de H-17 (δH 4,09 e 4,11) a C-1 (δC 173,8 – carbonil) confirmam a ligação entre o ácido carboxílico (ácido palmítico) e o álcool (solketal) usado na reação de esterificação. Espectros de RMN similares foram observados por Lima et al. (2018) para distintos ésteres de solketal demostrando as ligações entre o solketal e os distintos ácidos carboxílicos (octanóico e oléico) com deslocamentos para ^{1}H (faixa 3,44 – 4,36) e ^{13}C (faixa 171,3 – 173,36) semelhantes (LIMA, 2018). A análise espectroscópica (RMN) confirma a síntese bem-sucedida do éster (palmitato de solketila).

5.11.2 Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica – CIM e CMM

Os resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* do éster (Palmitato de Solketila) contra duas bactérias gram-positivas e três linhagens de fungos (leveduras) são apresentados na Tabela 11. Os valores de CMM (mínima quantidade de antibiótico capaz de destruir o 99,9% de uma amostra inoculada em condições padronizadas), para o éster foram >400 $\mu g \cdot mL^{-1}$ para todos os patógenos, indicando que o éster mostra ação bacteriostática/fungistática.

Segundo Holetz et al. (2002), uma boa atividade é considerada quando os valores de CIM (menor concentração de um antimicrobiano em inibir o crescimento visível de um microrganismo após a incubação em condições padronizadas) são menores que 100 $\mu g\ mL^{-1}$, uma atividade moderada de 100 a 500 $\mu g\ mL^{-1}$, uma atividade fraca de 500 a 1000 $\mu g\ mL^{-1}$ e inativo acima de 1000 $\mu g\ mL^{-1}$. Com relação à escala acima para avaliar a atividade antimicrobiana, o éster apresentou atividade moderada contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* com valores de CIM de 200 a 400 $\mu g\ mL^{-1}$ para ambas as leveduras.

Estes resultados podem ser devidos à sua alta hidrofobicidade, melhorando sua capacidade de interagir com as membranas celulares e/ou penetrar através da membrana celular desses patógenos (DU et al., 2018). Esses resultados estão de acordo com um estudo anterior sobre o uso de ésteres a base de solketal como potenciais agentes antimicrobianos (JOHNY et al., 2019).

Tabela 11 – Atividade antibiótica do éster – palmitato de solketila – contra fungos e bactérias.

Patógenos	**Ester**		**Fluconazol**	
	CIM ($\mu g\ mL^{-1}$)	**CMM ($\mu g\ mL^{-1}$)**	**CIM ($\mu g\ mL^{-1}$)**	**CMM ($\mu g\ mL^{-1}$)**
C. albicans	200-400	>400	0.312-0.625	20-40
C. tropicalis	>400	>400	2.5-5.0	>400
C. parapsilosis	200-400	>400	2.5-5.0	>400
	Ester		**Amoxicilina**	
	CIM ($\mu g\ mL^{-1}$)	**CMM ($\mu g\ mL^{-1}$)**	**CIM ($\mu g\ mL^{-1}$)**	**CMM ($\mu g\ mL^{-1}$)**
S. aureus	>400	>400	0.078-0.156	>400
L. monocytogenes	>400	>400	0.156-0.312	>400

O perfil antifúngico do éster mostra que o palmitato de solketila tem potencial para ser usado no controle de leveduras da espécie *Candida* (*C. albicans* e *C. parapsilosis)* relacionadas a infecções cutâneas e serve como um aditivo multifuncional seguro, com propriedades emulsificantes e antifúngicas. Estudos adicionais são necessários para entender completamente a eficácia antibacteriana do palmitato de solketila, como seu efeito contra outras leveduras e bactérias, a fim de justificar a real aplicação em diversos sistemas.

6. CONCLUSÃO

A preparação de biocatalisadores ativos na síntese enzimática de um biossurfactante (palmitato de solketila) por reação de esterificação direta de ácido palmítico e solketal em meio orgânico foi proposta com sucesso. Neste estudo três diferentes enzimas (LTL, LCR e LPF) foram imobilizadas por adsorção hidrofóbica em um suporte renovável e de baixo custo preparado por funcionalização de sílica de casca de arroz com grupos octil (Octil-SiO_2). Os três biocatalisadores preparados foram ativos em meios aquosos – hidrólise e orgânicos – reação de esterificação. A otimização de certos parâmetros na síntese enzimática de palmitato de solketila foi realizada por um planejamento fatorial completo (DCCR), empregando o biocatalisador heterogêneo derivado da lipase de *Thermomyces lanoginosus*, já que exibiu a maior atividade catalítica (656 ± 24 U/g) e a maior produtividade na síntese do éster (7 mmol/ min g_{bioc}). Uma porcentagem máxima de conversão de éster de 83% após 150 minutos de reação nas condições otimizadas (56°C, 800 U – 20% em massa de LTL–Octil–SiO_2 por volume de meio de reação, razão molar (ácido:álcool) de 1:3 com concentração inicial de 1000 mM para o ácido palmítico, ausência de peneira molecular e agitação de 240 rpm). Este estudo demonstrou que o modelo desenvolvido a partir do desenho experimental é adequado para a maximização da produção de palmitato de solketila. O biocatalisador preparado exibiu não apenas excelente atividade catalítica, mas também demonstrou ser estável, retendo 87% de sua atividade inicial após sete ciclos sucessivos de reação. A natureza do produto foi confirmada por meio de análise espectrométrico de RMN (^{1}H e ^{13}C). O éster purificado demonstrou ação bacteriostática/fungistática e atividade antimicrobiana moderada contra duas leveduras da espécie de *Candida* (*C. albicans* e *C. parapsilosis*). Os resultados obtidos mostraram que o suporte derivado promoveu a preparação de um biocatalisador heterogêneo (LTL-Octil-SiO_2) com alta atividade catalítica em reações de esterificação. Estas características são altamente promissoras para uso posterior deste biocatalisador não comercial na síntese de compostos importantes do ponto de vista industrial, devido à sua capacidade de imobilizar alta carga protéica, alta atividade catalítica nos meios aquoso e orgânico e reutilização satisfatória. Embora LCR e LPF imobilizados em Octil-SiO_2 tenham apresentado menor produtividade na hidrólise de emulsão de azeite e síntese de palmitato de solketila, eles podem ser aplicados com sucesso como potenciais biocatalisadores heterogêneos na produção de distintos compostos de interesse industrial.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

a) Aplicação do suporte preparado na imobilização de outras lipases comumente empregadas em reações de biotransformação;

b) Utilização dos biocatalisadores derivados da LCR e LPF na produção de outros ésteres empregados na indústria;

c) Produção de ésteres com propriedades surfactantes em modo continuo empregando o biocatalisador selecionado;

d) Caracterização físico-química do éster preparado como ponto de fusão, ponto de ebulição, viscosidade cinemática, índice de viscosidade, densidade, índice de acidez;

e) Produção de ésteres cetílicos empregando ácidos graxos provenientes de óleos vegetais e/ou gorduras animais;

f) Preparação de biocatalisadores utilizando suportes com áreas superficiais específicas e tamanho de poros maiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406-6436, 2013.

AKACHA, N. B.; GARGOOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 675-706, 2015.

ALARCÓN , M. R. V. **Producción de la lipasa Lip2 de Candida rugosa en el sistema Pichia pastoris: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis**. Departament d'Enginyeria Química - Universitat Autònoma de Barcelona. Balletera, Barcelona, p. 217. 2008.

ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thernodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1-12, 2017.

ALVES, M. D.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, n. 1, p. S377-S387, 2016.

ARAUJO, L. L. G. C.; SODRÉ, L. G. P.; BRASIL, L. R.; DOMINGOS, D. F.; OLIVEIRA, V. M.; CRUZ, G. F. Microbial enhanced oil recovery using a biosurfactant produced by Bacillus safensis isolated from mangrove microbiota - Part I biosurfactant characterization and oil displacement test. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 180, p. 950-957, 2019.

ASHJARI, M.; MOHAMMADI , M.; BADRI, R. Chemical amination of Rhizopus oryzae lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 128-134, 2015.

ASHU-ARRAH, B. A.; GLENNON, J. D. Supercritical carbon dioxide versus toluene as reaction media in silica functionalisation: Synthesis and characterisation of bonded aminopropyl silica intermediate. **Journal of Chromatography A**, v. 1501, p. 18-25, 2017.

AYSWARYA, E. P.; FRANCIS, V.; RENJU, V. S.; THACHIL, E. T. Rice husk ash – A valuable reinforcement for high density polyethylene. **Materials & Design**, v. 41, p. 1-7, 2012.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 255-264, 2015.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583-1600, 2014.

BASSI, J.; TODERO, M.; LAGE, F. A. P.; KHEDY, G. I.; DUCAS, J. D.; CUSTÓDIO, A. P.; PINTO, M. A.; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.

BELLOT, J. C.; CHOISNARD, L.; CASTILLO, E.; MARTY, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4-5, p. 362-369, 2001.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Candida rugosa Lipases: Molecular Biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, v. 14, n. 12, p. 1069-1087, 1998.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNANDEZ-PEREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 83-93, 2004.

BOLINA, I. C. A.; SALVIANO, A. B.; TARDIOLI, P. W.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO2 with glycine to immobilize microbial lipase – Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2354–2365, 2018.

BOLIVAR, J. M.; NIDETZKY, B. Oriented and selective enzyme immobilization on functionalized silica carrier using the cationic binding module Z basic2: design of a heterogeneous D-amino acid oxidase catalyst on porous glass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1490-1498, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemestry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: GUISAN, J. **Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, v. 1051, 2013. p. 15-31.

BUCHORI, L.; ANGGORO, D. D.; SUMANTRI, I.; PUTRA, R. R. Optimization of Monoglycerides Production Using KF/CaO-MgO Heterogeneous Catalysis. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**, v. 14, n. 3, p. 689-696, 2019.

BUNKOVA, L.; BUNKA, F.; JANIS, R.; KREJCI, J.; DOLEZALKOVA, I.; POSPISIL, Z.; RUZICKA, J.; TREMLOVA, B. Comparision of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spolage bacteria. **Acta Veerinaria Brno**, v. 80, n. 1, p. 29-39, 2011.

CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from Candida antarctica B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 171-176, 2009.

CAMERINI, F. V.; CHANIN, D. A.; BORBA, C. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. D. M. Biosurfactant production by Phialemonium sp. using agroindustrial wastes: influence of culture conditions. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 41, n. 1, p. e43484, 2019.

CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C.; FATTOR, D.; SPIZZO, P.; GARDOSSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chem Soc Rev**, v. 42, p. 6262, 2013.

CARDONA, S. M. V.; GONZALEZ, R. C.; FRANCO, A. C.; CARDEÑO, F. L.; RÍOS, L. A. Obtención de monoglicéridos de aceite de ricino emplenado glicerina refinada y cruda: estudio de las principales variables del proceso. **Vitae**, v. 17, n. 2, p. 128-134, 2010.

CARDOZA GALDÁMEZ, E. V. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos. 2002.

CARVALHO, N. B.; BARBOSA, J. M.; OLIVEIRA, M. V. S.; FRICKS, A. T.; LIMA, Á. S.; SOARES, M. F. iochemical properties of Bacillus sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol gel process. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 55-58, 2013.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Use of modified silicas for lipase immobilization. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; DOS SANTOS, J. C.; DE AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CETINA MEDINA, D. M. **Estudio de la glicerólisis de trioleína para la produccion de monoglicéridos vía enzimática con lipasas de Candida rugosa y de Mucor Miehei**. Tesis de maestría. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 2010.

CETINA, D. M.; GIRALDO, G. I.; ORREGO, C. E. Application of response surface design to solvent, temperature and lipase selection for optimal monoglyceride production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 1-2, p. 13-19, 2011.

CHOWDHURY, A.; CHAKRABORTY, R.; MITRA, D.; BISWAS, D. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 783-789, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard. M27-A3**. 3rd. ed. Wayne, PA: CLSI, v. 28, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Aerobic Bacteria. Approved Standar. M07-A10**. 10th. ed. Wayne, PA: CLSI, v. 35, 2015.

CONAB. Perspectivas para a agropecuária - Arroz / Companhia Nacional de Abastecimento. **Volume 7 – Safra 2019/2020**, 2019. Disponivel em: <https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria/item/download/28825_2ed3fc3b5b25a350206d276620cf1c85>. Acesso em: 15 jan. 2020.

COOPER, G.; GOLDENBERG, G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229., 1987.

CORICI, D. L.; FERRARIO, V.; PELLIS, A.; EBERT, C.; LOTTERIA, S.; CANTONE, S.; VOINOVICH, D.; GARDOSSI, L. Large scale applications of immobilized enzymes call for sustainable and inexpensive solutions: rice husks as renewable alternatives to fossil-based organic resins. **RSC Advances**, v. 6, n. 68, p. 63256-63270, 2016.

CUI, S.; YU, S.; LIN, B.; SHEN, X.; ZHANG, X.; GU, D. Preparation of amine-modified SiO_2 aerogel from rice husk ash for CO2 adsorption. **Journal of Porous Materials**, v. 24, n. 2, p. 455–461, 2017.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DOLEZALOVA, M.; JANIS, R.; SVOBODOVA, H.; KASPARKOVA, V.; HUMPOLICEK, P.; KREJCI, J. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C11:0) and undecenoic (C11:1) acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 10, p. 1106-1114, 2010.

DONG, A.; ZHANG, X.; LIANG, F.; XIAN, M.; FENG, D.; YE, Z. Synthesis, surface properties of glucosyl esters from renewable materials for use as biosurfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 577, p. 57-264, 2019.

DORCHEH, A. ; ABBASI, M. H. Silica aerogel; synthesis, properties and characterization. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 199, n. 1-3, p. 10-26, 2008.

DU, L.; JIANG, Z.; XU, L.; ZHOU, N.; SHEN, J.; DONG, Z.; SHEN, L.; WANG, H.; LIO, X. Microfluidic reactor for lipase-catalyzed regioselective synthesis of neohesperidin ester derivatives and their antimicrobial activity research. **Carbohydrate Research**, v. 455, p. 32-38, 2018.

FACIN, B. R.; MELCHIORS, M. S.; VALÉRIO, ; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Driving Immobilized Lipases as Biocatalysts: 10 Years State of the Art and Future Prospects. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 14, p. 5358-5378, 2019.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERRAZ, N. L.; DA, V.; BRITO, S.; LUMA , C. A Low-Cost Support for Lipase Immobilization Produced from Sugarcane Bagasse. **International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering** , v. 98, n. 9, p. 61-65, 2016.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A. C.; BAPTISTA, F. O.; DA FONSECA, M. M. R. Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. **Journal of Molecular Cataysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 699-711, 2001.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A. C.; DA FONSECA, M. M. R. Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by Candida rugosa lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 1-2, p. 71-80, 2003.

FERRETTI,. **Valoración catalítica de glicerol: Síntesis de monoglicéridos**. Santa Fe, Argentina. 2010.

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399-7423, 2019.

FREITAS , L.; PAULA, A. V.; DOS SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using Penicillium

camembertii lipase immobilized on epoxy SiO2-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1, p. 87-90, 2010.

FREITAS , L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic Synthesis of Glyceride Esters in Solvent-Free System: Influence of the Molar Ratio, Lipase Source and Funtional Activating Agent of the Suport. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, p. 1360-1366, 2007.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Monoglycerides: production by enzymatic route and applications. **Química Nova**, v. 3, n. 6, p. 1514-1521, 2008.

GAO, Z.; CHU, J.; JIANG, T.; XU, T.; WU, B.; HE, B. Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO2: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 152-159, 2018.

GHAMGUI, H.; MILED , N.; REBAI, A.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. Production of mono-olein by immobilized Staphylococcus simulans lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 717-723, 2006.

GHOLAMZADEH, P.; ZIARANI, G. M.; BADIEI, A. Immobilization of lipases onto the SBA-15 mesoporous silica. **Journal of Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 3, p. 131-150, 2017.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; HEIDELBERG, T.; CHISTI, Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2079–2090, 2011.

GUO, Z.; XU, X. Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system. **Green Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 54-62, 2006.

HANDAYANI, S.; TAMARA PUTRI, A. T.; SETIASIH, S.; HUDIYONO, S. Enzymatic Synthesis of Glyserol-Coconut Oil Fatty Acid and Glycerol-Decanoic Acis Ester as Emulsifier and Antimicrobial Agents Using Candida rugosa Lipase EC 3.1.1.3. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 012019, p. 299, 2018.

HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas--benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6277-6289, 2013.

HE, M.; LI, Y.; PI, F.; JI, J.; HE, X.; ZHANG, Y.; SUN , X. A novel detoxifying agent: using rice husk carriers to imobilize zearalenone-deprading enzyme from Aspergillus nigel FS10. **Food Control**, v. 68, p. 271-279, 2016.

HEMA , T.; SEGHAL KIRAN, G.; SAJAYYAN, A.; RAVENDRAN, A.; PRIYADHARSHINI; SELVIN, J. Response surface optimization of a glycolipid biosurfactant produced by sponge associated marine bacterium Planococcus sp. MMD26. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 101071, 2019.

HOLETZ, F. ; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; GARCIA CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. creening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme Immobilization: An Update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185-205, 2013.

HUSAIN, Q. Nanomaterials Immobilized Cellulolytic Enzymes and their Industrial Applications: A Literature Review. **JSM Biochemistry & Molecular Biology**, v. 4, n. 3, p. 1029, 2017.

HWANG, S.; LEE, S.; AHN, I.-S.; JUNG, J.-K. Highly efficient production of monoglycerides by the continuous removal of fatty acids from lipase-catalyzed oil hydrolysis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 5-6, p. 290-295, 2009.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JEAN, G.; SCIAMANNA, V.; DEMUYNCK, M.; CAMBIER, F.; GONON, M. Macroporous ceramics: Novel route using partial sintering of alumina-powder agglomerates obtained by spray-drying. **Ceramics International**, v. 40, n. 7, p. 10197-10203, 2014.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5-6, p. 801-821, 2014.

JOHNY, J.; JATLA, A.; ERUVA , V. K.; MISRA, S.; KAKI, S. S. Synthesis, characterization and evaluation of 1-monoacylglycerols of unsaturated fatty acids as potential bioactive lipids. **Grasas y aceites**, v. 70, n. 4, p. e325, 2019.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, ; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistr**, v. 40, n. 5, p. 1525-1530, 2005.

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

KHAN, N. R.; JADHAV, S. V.; RATHOD, V. K. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 522-529, 2015.

KIM, S. H.; KIM, S.-J.; PARK, S.; KIM, H. K. Biodiesel production using cross-linked Staphylococcus haemolyticus lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 10-16, 2013.

KUMAR , A.; SENGUPTA, B.; DASGUPTA MANDAL, D.; MANDAL, T.; DATTA, S. Recovery of value added products from rice husk ash to explore an economic way for recycle and reuse of agricultural waste- a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, p. 47-65, 2016.

KUMAR , D.; NAGAR, S.; BHUSHAN, I.; KUMAR, L.; PARSHAD, R.; GUPTA, V. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51-61, 2013.

KWON, S. J.; HAN, J. J.; RHEE, J. S. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 8, p. 700-704, 1995.

KYEONG YOON, B.; JACKMAN, J. A.; VALLE-GONZALEZ, E. R.; CHO, N.-J. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing,

and Therapeutic Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1114-1154, 2018.

LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H. H.; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from Thermomyces lanuginosus on hydriphobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.

LI, Y.; GAO, F.; WEI, W.; QU, J.-B.; MA, G.-H.; ZHOU, W.-Q. Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 182-189, 2010.

LIMA, L. C. D.; PERES, D. G. C.; MENDES , A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the synthesis of wax ester catakyzed by lipase immobilized on glutaraldehye-activated rice husk particles. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, p. 1-12, 2018.

LIMA, L. N.; MENDES, A. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. Performance of different immobilized lipases in the synthesis of short and long chain carboxylic acid esters by esterification reactions in organic media. **Molecules**, v. 23, p. 766, 2018.

LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, M. J.; DE CASTRO, H. F.; DA ROS, P. C.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L.; TARDOPÇO, P. W. Immobilization of Pseudomonas fluorescens lipase on hydrophobic supports and application in biodisel synthesis by transesterification of vegetables oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523-535, 2015.

LIMA, P. C. **Síntese de ésteres de solketal utilizando mistura de SiO_2-SO_3H e $[Bu_4N][BF_4]$**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis. Diamantina: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 2018.

LIU, D.; ZHANG, W.; LIN , H.; LI, Y.; LU, H.; WANGA, Y. Hierarchical porous carbon based on the self-templating structure of rice husk for high-performance supercapacitors. **RSC Advances**, v. 5, n. 25, p. 19294-19300, 2015.

LIU, Y.; GUO, Y.; GAO, W.; WANG, Z.; MA, Y.; WANG, Z. Simultaneous preparation of silica and activated carbon from rice husk ash. **Journal of Cleaner Production**, v. 32, p. 204-209, 2012.

LV, J. S.; LIU , X. Y.; XU, J. X.; DENG, Y. F.; WU, Z.; WANG, Y. M.; FAN, M. Y.; XU , H. Preparation and properties of adsorption material from corn stalks core when used for enzyme immobilization and the subsequent activities of the adsorbed enzymes. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 787-796, 2013.

MACHADO, N. B. **Preparação e caracterização de partículas de sílica da casca de arroz funcionalizada na imobilização de lipase e aplicação na síntese de ésteres.** Dissertação de Mestrado (Química). Alfenas, Minas Gerais: Universide Federal de Alfenas. 2018.

MACHADO, N. B.; MIGUEZ, P.; BOLINA, I. C. A.; SALVIANO, B.; GOMES, R. A. B.; TAVANO, O. L.; LUIZ, J. H. H.; TARDIOLI, W.; CREN, C.; MENDES, A. Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Tecnology**, v. 128, p. 9-21, 2019.

MADDULURI, V. R.; MANDARI, K. K.; VELPULA, V.; VARKOLU, M.; KAMARAJU, S. R. R.; KANG, M. Rice husk-derived carbon-silica supported Ni catalysts for selective hydrogenation of biomass-derived furfural and levulinic acid. **Fuel**, v. 261, p. 116339, 2020.

MANOEL, E. A.; DOS SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53-57, 2015.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de Thermomyces lanuginosus. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VELEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. D. L. C.; DE CASTRO, H. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodisels synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 503-511, 2012.

MEYERS, D. **Surfactant science and technology**. 3ra edición. ed. New York: Wiley-Interscience, 2006.

MIGUEZ, J. P.; GAMA, S. R.; BOLNA, I. C. A.; DE MELO, C. C.; CORDDEIRO, M. R.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 139, p. 296-308, 2018.

MIRANDA , J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; LAGE, F. A. P.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Immobilization of Thermomyces lanuginosus lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392-403, 2014.

MO, Q.; FU, A.; DENG, L.; ZHAO, M.; LI, Y.; ZHANG, H.; FENG, F. High-Dose Glycerol Monolaurate Up-Regulated Beneficial Indigenous Microbiota without Inducing Metabolic Dysfunction and Systemic Inflammation. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 1981, 2019.

MOHAMAD, N. R.; CHE MARZUKI, N. H.; BUANG, N. A.; HUYOB, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment** , v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

MOR, S.; CHHODEN, K.; RAVINDRA, K. Application of agro-waste rice husk ash for the removal of phosphate from the wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 129, p. 673-680, 2016.

MOTEVALIZADEH, S. F.; KHOOBI, M.; SADIGHI, A.; KHALIVAND-SEDAGHEH, M.; PAZHOUHANDEH, M.; RAMAZANI, A.; FARAMARZI, M. A.; SHAFLEE, A. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 120, p. 75-83, 2015.

MUGO, S. M.; AYTON, K. Lipase Immobilized Methacrylate Polymer Monolith Microreactor for Lipid Transformations and Online Analytics. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 1, p. 65-72, 2013.

MULEY, A. B.; CHAUDHARI, S. A.; SINGHAL, R. S. Non-covalent conjugation of cutinase from Fusarium sp. ICT SAC1 with pectin for enhanced stability: Process minutiae, kinetics, thermodynamics and structural study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 729-740, 2017.

MULEY, A. B.; THORAT, A. S.; SINGHAL, R. S.; BABU, K. H. A tri-enzyme co-immobilized magnetic complex: Process details, kinetics, thermodynamics and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1781–1795, 2018.

MURARO, P.; OLIVEIRA, C. C.; DENIS, F. A. Aproveitamento da casca de arroz (CA) no município de Bagé-RS. **VI Simposio do Agronegócio**, Porto Alegre/RS, Octubro 2018.

NASCIMENTO FILHO, B.; FRANCO, C.. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Quimica**, v. 7, n. 6, p. 1968-1987, 2013.

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

NIMLOS, M. R.; BLANKSBY, S. J.; QIAN, X.; HIMMEL, M. E.; JONHSON, D. K. Mechanisms of Glycerol Dehydration. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 18, p. 6145-6156, 2006.

OLI, P.; WARD, R.; ADHIKARI, B.; TORLEY, P. Parboiled rice: Understanding from a materials science approach. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 173-183, 2014.

ÖZER , H.; SÖKMEN , M.; GÜLLÜCE , M.; ADIGÜZEL, A.; SAHIN, F.; SÖKMEN, A.; KILIÇ, H.; BARIS, O. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of Hippomarathrum microcarpum (Bieb.) from Turkey. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 3, p. 937-942, 2007.

PÁEZ , B. C.; MEDINA, A. R.; RUBIO, F. C.; MORENO, P. G.; GRIMA, M. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 845-853, 2003.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 279-286, 2002.

PALUDO, N.; ALVES, J. S.; ALTMANN, C.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the

synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized Thermomyces lanuginosus lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 89-94, 2015.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 343-355, 2003.

PÉREZ-PARIENTE, J.; DÍAZ, I.; MOHINO, F.; SASTRE, E. Selective synthesis of fatty monoglycerides by using functionalised mesoporous catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 254, n. 2, p. 173-188, 2003.

POUILLOUX, Y.; METAYER, S.; BARRAULT, J. Synthesis of glycerol monooctadecanoate from octadecanoic acid and glycerol. Influence of solvent on the catalytic properties of basic oxides. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 589-594, 2000.

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

SALIBA, S.; RUCH, P.; VOLKSEN, W.; MAGBITANG, T. P.; DUBOIS, G.; MICHEL, B. Combined influence of pore size distribution and surface hydrophilicity on the water adsorption characteristics of micro- and mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 226, n. 221-228, 2016.

SANTOS, D. K. F.; RESENDE, A. H. M.; ALMEIDA, D. G.; SOARES DA SILVA, R. C. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. Candida lipolytica UCP0988 Biosurfactant: Potential as a Bioremediation Agent and in Formulating a Commercial Related Product. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 767-777, 2017.

SANTOS, D. K.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401-432, 2016.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SCHERER , R. P.; DALLAGO, R. L.; PENNA, F. G.; BERTELLA , F.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; PERGHER, S. B. C. Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 290-294, 2012.

SCHIRMANN, J. G.; DEKKER, R. F. H.; BORSATO, D.; BARBOSA-DEKKER, A. M. elective control for the laccase-catalyzed synthesis of dimers from 2,6- dimethoxyphenol: Optimization of 3,3',5,5'-tetramethoxy-biphenyl-4,4'-diol synthesis using factorial design, and evaluation of its antioxidant action in biodiesel. **Applied Catalysis A: General**, v. 555, p. 88-97, 2018.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3-4, p. 141-147, 2005.

SHEN, Y. Rice Husk Silica-Derived Nanomaterials for Battery Applications: A Literature Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 5, p. 995-1004, 2017.

SIGMA-ALDRICH. Catalogo de Produtos. Silica, 2020a. Disponivel em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=siO2&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt&region=BR&focus=product>. Acesso em: 2020 jan. 17.

SIGMA-ALDRICH. Catalogo de Produtos. Lipase, 2020b. Disponivel em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=lipase&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt&region=BR&focus=product>. Acesso em: 2020 fev. 27.

SILVA, N. C. A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139-149, 2014.

SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 12523-12542, 2014a.

SIM, C. Q.; O´CONNOR, C. J.; ROBERTON, M. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against Helicobacter pylori. **FEMS Immunology & medical microbiology**, v. 36, n. 1-2, p. 9-17, 2003.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and Utilization of Candida rugosa Lipase Immobilized on Controllled Pore Silica. **Applied Biochemestry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 745-757, 1999.

SONG, W.; LIU, Y.; QIAN, L.; NIU, L.; XIAO, L.; HOU, Y.; WANG, Y.; FAN , X. Hyperbranched polyremic ionic liquid with imidazolium backbones for highly efficient removal of anionic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, p. 482-491, 2016.

SOUZA, M. F.; MAGALHÃES, W. L. E.; PERSEGIL, M. C. Silica derived from burned rice hulls. **Materials Research**, v. 5, n. 4, p. 467-474, 2002.

SZTAJER, H.; BORKOWSKI, J.; SOBIECH, K. Purification and some properties of Pseudomonas fluerescens lipase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 65-71, 1991.

TAO, Y.; CUI, C.; SHEN, H.; LIU, L.; CHEN, B.; TAN, T. Enhancing trimethylolpropane esters synthesis through lipase immobilized on surface hydrophobic modified support and appropriate substrate feeding methods. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58, n. 59, p. 60-97, 2014.

THORGEIRSDÓTTIR, T.; KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; THORMAR, H.; AXELDÓTTIR, Í.; HOLBROOK, P. Antimicrobial activity of monocaprin: a monoglyceride with potencial use as a denture desinfectant. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 64, n. 1, p. 21-26, 2006.

THORMAR, H.; HILMARSSON, H. The role of microbicidal lipids in host defense against phatogens and their potential as therapeutic agents. **Chemistry and physics of lipids**, v. 150, n. 1, p. 1-11, 2007.

TODERO, L. M.; BASSI, J. J.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, C. C.; BARBOZA, J. C. S.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzd by immobilized lipase on poly-mechacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, n. 8, p. 1601-1613, 2015.

TU, M.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignina from lodgepole pine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7771-7778, 2009.

TUFIÑO, C.; BERNAL, C.; OTTONE, C.; ROMERO, O.; ILLANES, A.; WILSON, L. Synthesis with Immobilized Lipases and Downstream Processing of Ascorbyl Palmitate. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3227, 2019.

VAIBHAV , V.; VIJAYALAKSHMI , U.; ROOPAN , S. M. Agricultural waste as a source for the production of silica nanoparticles. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 139, p. 515-520, 2015.

VESCOVI, V.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Immobilized lipases on functionalized silica as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 212, 2017.

VESCOVI, V.; KOPP, W.; GUISAN, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLLI, P. W. Improved catalytic properties of Candida antarctica lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2055-2066, 2016.

VULFSON, E. N. In: WOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. **Lipases:** Their Structure, Biochemistry and Application. Great Britain: Cambridge University Press, 1994. p. 271.

WANG, W.; MARTIN, J. C.; ZHANG, N.; MA, C.; HAN, A.; SUN, L. Harvesting silicananoparticles from rice husks. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 6981-6990, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, D.-H.; ZHANG, J.-Y.; CHEN, N.; ZHI, G.-Y. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, v. 190, p. 629-633, 2016.

WILSON, B.; ABRAHAM, G.; MANJU, V. S.; MATHEW, M.; VIMALA, B.; SUNDARESAN, S.; NAMBISAN, B. Antimicrobial activity of Curcuma zedoaria and Curcuma malabarica tubers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 147-151, 2005.

ZDARTA, J.; KLAPISZEWSKI, L.; JEDRZAK, A.; NOWICKI, M.; MOSZYNSKI, D.; JESIONOWSKI, T. Lipase B from Candida antarctica immobilized on a silica-lignin matrix as a stable and reusable biocatalytic system. **Catalysts**, v. 7, p. 14, 2017.

ZHANG, H.; WEI, H.; CUI, Y.; ZHAO, G.; FENG, G. Antibacterial interactions of monolaurin with commonly used antimicrobials and food components. **Journal of Food Science. Food Microbiology and Safety**, v. 74, n. 7, p. M418-M421, 2009.

ZHANG, S.; GAO, H.; LI, J.; HUANG, Y.; ALSAEDI, A.; HAYAT, T.; XU, X.; WANG, X. Rice husks as a sustainable silica source for hierarchical flower-like metal silicate architectures assembled into ultrathin nanosheets for adsorption and catalysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 92-102, 2017.

ZHAO, L.; ZHANG, H.; HAO, T.; LI, S. In vitro antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters againts five food-related bacteria. **Food Chemistry**, v. 187, p. 370-377, 2015.

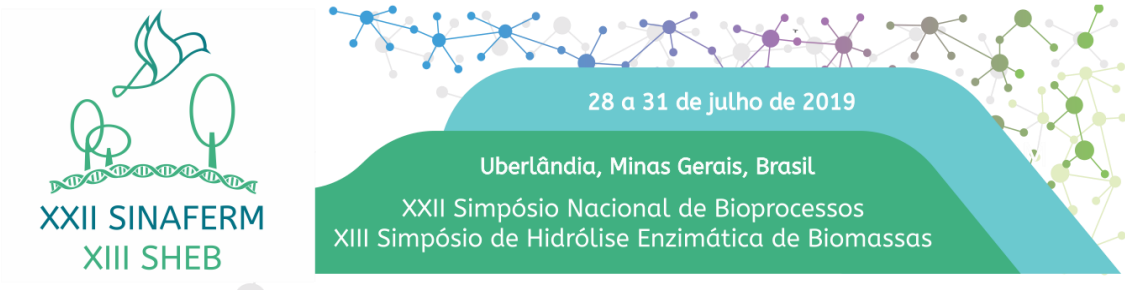
ZHAO, X.; QI , F.; YUAN, C.; DU , W.; LIU, D. Lipase-catalized process for biodiesel production: enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015a.

ZHAO, Y.; LIU, J.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. Optimization of Candida sp. 99-125 lipase catalyzed esterification for synthesis of monoglyceride and diglyceride in solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 157-162, 2011.

ZHU, J.; SUN, G. Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities. **Reactive and Functional Polymers**, v. 72, n. 11, p. 839-845, 2012.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139-14194, 2014.

APÊNDICE I



COVALLENT ATTACHMENT OF LIPASE ON GLUTARALDEHYDE-ACTIVATED AMINO–SIO_2 PARTICLES: EFFECT OF CROSLLINKING AGENT ON THE IMMOBILIZATION PARAMETERS

Iara C.A. Bolina[1], Patricia A.M. Ortiz[1], Érika C. Cren[1] and Adriano A. Mendes[2]

[1] Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Química

[2] Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Química

E-mail: paty_huu5@hotmail.com

ABSTRACT

A novel support has been prepared by sequential functionalization of rice husk silica (RHS) with (3-aminopropyl)triethoxysilane (3–APTES) to prepare Amino–SiO_2, followed by activation with glutaraldehyde (GA). This support has been used in the immobilization of lipase from Thermomyces lanuginosus (TLL) via covalent attachment. The effect of GA concentration varying from 0.25% v/v to 4% v/v on the immobilization parameters and thermal stabilization of TLL has been successfully evaluated. At low initial protein loading (5 mg/g), TLL was fully attached on the support surface activated at different GA concentration. However, a drastic decrease in hydrolytic activity (from 216.6 ± 12.4 U/g to 28.6 ± 0.9 U/g) by increasing the GA concentration has been observed. The immobilization of TLL by using activated support prepared at 0.5% GA (v/v) achieved its maximum stabilization – 31.6 times more stable than soluble lipase at 60 °C. The prepared biocatalyst has potential for use in industrial processes due to its high catalytic activity and thermal stability.

1. INTRODUCTION

The use of glutaraldehyde-activated supports in the preparation of biocatalysts with high immobilized enzyme concentration and thermal stability has been well-documented (Lima et al., 2018; Migneault et al., 2004). High stabilization of the three-dimensional structure of several enzymes via covalent attachment on glutaraldehyde-activated supports has been reported due to intense interaction between nucleophilic groups of enzymes and pre- […]

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOSSURFACTANTE POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO

ORTIZ, P.A.M.[1], GAMA, R.S.[2] e MENDES, A.A.[2]

[1] Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais
[2] Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas
E-mail para contato: paty_huu5@hotmail.com

Reações de esterificação conduzidas por catalisadores químicos clássicos (homogêneos ou heterogêneos) apresentam baixa seletividade e a necessidade de altas temperaturas de reação que causam a formação de subprodutos indesejáveis (GUMEL *et al.*, 2011). Estas desvantagens podem ser superadas pelo uso de lipases devido à alta seletividade e requerimento de condições brandas de reação. A grande desvantagem do uso de lipases na forma solúvel é a sua baixa estabilidade e difícil recuperação e reúso (ADLERCREUTZ, 2013). A imobilização consiste no confinamento de enzimas em suportes para posterior reúso do biocatalisador. Além disso, este processo pode melhorar a estabilidade térmica do biocatalisador e permite a aplicação de diferentes configurações de reatores (ADLERCREUTZ, 2013; MACHADO *et al*., 2019). Diferentes suportes disponíveis comercialmente têm sido empregados na imobilização de lipases. Entretanto, o custo de alguns destes suportes é bastante elevado, o que impede a aplicação de lipases em processos industriais. Consequentemente, o uso de suportes obtidos a partir de resíduos agroindustriais torna-se uma alternativa bastante atrativa na imobilização e estabilização de lipases. Neste estudo, sílica de casca de arroz, um resíduo agroindustrial comumente encontrado no Brasil, foi funcionalizado com trietóxi(octil)silano – OCTES (Octil–SiO_2) para a obtenção de um suporte hidrofóbico e usado na imobilização por adsorção física de três lipases comerciais de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF). Os biocatalisadores preparados foram caracterizados e empregados na síntese de um biossurfactante por esterificação de ácido palmítico e DL-Isopropilidenoglicerol (Solketal) em meio heptano.

Partículas de SiO_2 foram obtidas a partir de tratamento termoquímico de casca de arroz e funcionalizada com OCTES, conforme metodologia proposta por Machado *et al.* (2019). O suporte funcionalizado foi empregado na preparação de biocatalisadores por adsorção física das três lipases via incubação de 1 g do suporte em 19 mL de solução enzimática preparada em pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 5 mmol L^{-1}) na relação suporte:solução enzimática de 1:20. O carregamento de proteína usado nas imobilizações foi fixada em 40 mg g-1 de suporte. [...]

I CONGRESS ON SCIENCE, BIODIVERSITY AND SUSTAINABILITY

21-22 October 2019. UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF A SURFACTANT ESTER CATALYZED BY LIPASE IMMOBILIZED ON FUNCTIONALIZED SiO_2-BASED SUPPORT

Patricia Ortiz[1], Adriano Aguiar[2]
[1]Universidade Federal de Minas Gerais, [2]Universidade Federal de Alfenas
e-mail: paty_huu5@hotmail.com

Biosurfactants are a promising alternative in replacing fossil fuel derived chemical surfactants due to their ideal surfactant properties, high biodegradability and biocompatibility [1]. Lipase-catalyzed esterification reactions offer an attractive alternative to traditional processes employing chemical catalysts, due to their high selectivity and the requirement for mild reaction conditions. The major disadvantages of the use of free lipases are their separation for later application and poor solvent tolerance capability. These problems can be overcome by immobilization, physical adsorption via hydrophobic interaction is the preferred immobilization protocol of lipases due to it interfacial activation mechanism [2]. In this study, a surfactant ester was synthesized via direct esterification reaction using immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) as potential biocatalyst. TLL was immobilized via hydrophobic interactions in a SiO_2-based support prepared by hydrothermal treatment of rice husk silica and functionalized with triethoxy(octyl)silane according to the methodology proposed by Machado et al. (2019) [3]. The heterogeneous biocatalysts were prepared by incubating 1 g of support in 19 mL of enzyme solution prepared at pH 7.0 (5 mM sodium a phosphate buffer) and containing protein loading of 40 mg/g support. Immobilization parameters: a) immobilized protein (IP) and, b) hydrolytic activity - hydrolysis of olive oil emulsion (HA) were determined as described by Machado et al. (2019). The esterification reactions were performed by incubating 6 mL of reaction mixture containing 1 M of acid at molar ratio of 1:3 (palmitic acid:solketal) in heptane medium and 800 U of prepared biocatalyst, at 56 °C and 240 rpm. Samples (100 μL) were periodically withdrawn from the reaction mixture and titrated (30 mM NaOH solution) to determine the residual acid concentration and consequently conversion (%). Reusability tests were performed after 6 consecutive cycles of ester synthesis in batch systems. Ester conversion percentage was estimated at the end of each run according to Machado et al. (2019). The results indicated that the prepared biocatalyst was highly active in the hydrolysis reaction – HA of 656.0 ± 23.9 U g^{-1} and IP of 21.2 ± 2.2 mg g^{-1} of support. In the esterification reaction, the biocatalyst presented high catalytic activity with maximum conversion around 84% after 150 min of reaction. The biocatalyst also showed satisfactory reuse stability, retaining 90% of its initial activity after 6 consecutive cycles (150 min) of solketila palmitate ester synthesis in batch systems. These results indicate the relevant use of the prepared biocatalyst prepared by hydrophilic adsorption of TLL on functionalized support using RHS as silica source, a renewable and low-cost support, to synthesize a surfactant ester due to its high catalytic activity and reusability.

[1] DONG, A. et al. Synthesis, surface properties of glucosyl esters from renewable materials for use as biosurfactants. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects, v. 577, p. 57-264, 2019.
[2] ADLERCREUTZ, P. Immobilization and application of lipases in organic media, Chem. Soc. Rev., v. 42, p. 6406-6436, 2013.
[3] MACHADO, N.B et al. Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption, Enzyme Microb. Technol., v. 128, p. 9-21, 2019.