

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TAUANE STRAATMANN SUDBRACK

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM MONTMORILONITA E APLICAÇÃO
EM REAÇÕES OLEOQUÍMICAS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Martinelli

Orientadora

Porto Alegre, março de 2012.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre abril de 2010 e março de 2012, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Professora Doutora Márcia Martinelli. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz


Prof. Dra. Katia Bernardo Gusmão


Prof. Dr. Marco Flores Ferrão


Prof.^a Dr.^a Márcia Martinelli
Orientadora


Tauane Straatmann Sudbrack

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, por acreditar na concretização deste trabalho, pelos momentos de carinho e por entender a minha ausência em alguns momentos importantes. Aos meus pais Jarson e Angela e minhas irmãs Lisiara e Janine.

A professora Márcia Martinelli pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa, pela sua amizade nos momentos de dificuldade e pela tolerância durante minha passagem pelo laboratório.

Ao pessoal da Bioplus pelo apoio nos ensaios enzimáticos e pelo acolhimento.

As meninas do ICTA-UFRGS, especialmente Manuela e Carla, pelo apoio nos momentos de dúvidas.

A professora Roberta e ao professor Luis Fonseca pela atenção, incentivo e por todos os esclarecimentos.

Ao pessoal do LTM-UFRGS, especialmente ao professor Jorge Rubio e a Solange Guidali Amaral pelas análises de BET/BJH.

Aos colegas do laboratório D-112: Becker, Maritana, Dani, Livia e Guilherme. Obrigada pela amizade, carinho, paciência, apoio e por contribuírem com meu crescimento pessoal e profissional.

Aos bolsistas Ellen e Lucas, minha eterna gratidão pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do PPGQ que, de uma maneira ou de outra, me ajudaram a chegar ao final desta jornada, especialmente aos meus amigos Carol, Gi e Fabrício.

Aos meus queridos amigos Raquel, Alex e Willian pela parceria nos momentos desgastantes de estudos e pelas risadas mesmo nos momentos de aflição.

Meu carinho especial aos meus amigos Alex e Mauro por todos os momentos de conforto, de ensinamento, por suportarem meus transtornos de humor nos dias de maior dificuldade e por mostrarem que a amizade é um tesouro muito valioso. Muito obrigada!

A minha amiga-irmã Raquel, não existem palavras que expressem minha gratidão por tudo! Fostes parte fundamental no desenvolvimento do meu trabalho e responsável por muito da minha evolução como pessoa. Obrigada por toda a dedicação, pelos abraços confortantes, pelas palavras que serviram de pilar para que eu não desistisse e por me fazer enxergar as coisas com outros olhos.

Ao meu padrinho Paulo pelo acolhimento, carinho e compreensão.

Em especial ao meu amor Vinícius pelo conforto, amizade, carinho, tolerância e pelo apoio nos momentos de angústia e de cansaço.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. REAÇÕES ENVOLVENDO O GRUPO CARBOXÍLICO	3
2.1.1. Hidrólise de óleos vegetais	4
2.1.2. Alcoólise de óleos vegetais.....	6
2.2. ENZIMAS	8
2.2.1. Classificação das enzimas	8
2.2.2. Lipases.....	9
2.3. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	13
2.3.1. Imobilização por adsorção.....	14
2.3.2. Imobilização via interação iônica	15
2.3.3. Imobilização por ligação covalente.....	15
2.3.4. Imobilização por ligação cruzada (<i>cross-linking</i>).....	15
2.3.5. Imobilização por confinamento em membranas	16
2.4. SUPORTES.....	16
2.4.1. Argila montmorilonita.....	17
2.5. BIOCATALÍSE EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. PARTE EXPERIMENTAL	23
4.1. MATERIAIS E REAGENTES	23
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCATALISADORES	23
4.2.1. Espectroscopia de Reflectância Difusa na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS).....	23
4.2.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível	24
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS).....	24
4.2.4. Área Superficial Específica (BET), Volume e Diâmetro do Poro (BJH).....	24

4.2.5. Difração de Raios-X (DRX)	24
4.2.6. Análise Termogravimétrica (TGA)	24
4.2.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹ H)	25
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS	25
4.3.1. Índice de Iodo	25
4.3.2. Índice de Acidez	26
4.3.3. Índice de Saponificação	26
4.3.4. Determinação da massa molar média e do número de ligações duplas do azeite de oliva e do óleo de soja	27
4.4. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO EM ÉSTERES	28
4.5. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPOLASE[®] NA ARGILA MMT K10	30
4.5.1. Imobilização pelo método de adsorção	30
4.5.2. Imobilização pelo método de ligação covalente	30
4.5.2.1. Tratamento da MMT K10 com glutaraldeído	30
4.5.2.2 Modificação da MMT K10 com APTES e glutaraldeído	31
4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	31
4.7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	32
4.8. ESTUDO DE ESTABILIDADE NO ARMAZENAMENTO	33
4.9. REAÇÕES DE HIDRÓLISE	33
4.10. REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA	34
4.11. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OPERACIONAL	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA IMOBILIZADO	35
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS	46
5.3. REAÇÕES DE HIDRÓLISE	46
5.4. REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA	51
5.5. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OPERACIONAL	53
5.6. ESTABILIDADE NO ARMAZENAMENTO DOS SISTEMAS IMOBILIZADOS	55
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS	58
8. BIBLIOGRAFIA	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de um triglicerídeo e pontos suscetíveis a reações químicas: (1) dupla ligação; (2) carbono alílico; (3) grupo éster; (4) carbono α e (5) carbono dialílico.....	3
Figura 2. Reações envolvendo o grupo carboxílico: (1) hidrólise; (2) esterificação; (3) alcoólise e (4) glicerólise.....	3
Figura 3. Hidrólise de um triglicerídeo.....	4
Figura 4. Estrutura dos ácidos graxos essenciais das famílias ômega-6 e ômega-3.....	5
Figura 5. Metabolismo de ácidos graxos essenciais pertencentes à família ômega-3 e ômega-6.....	5
Figura 6. Reações que ocorrem na alcoólise de triglicerídeos.....	7
Figura 7. Mecanismo de ativação interfacial na presença de uma interface hidrofóbica.....	10
Figura 8. Mecanismo catalítico das lipases.....	11
Figura 9. Distribuição dos resíduos de Lis (cinza), Asp e Glu (preto) em quatro faces da superfície da TLL. a) face frontal; b) rotação 90 °; c) rotação 180 ° e d) rotação 270 °.....	11
Figura 10. Reações catalisadas por lipases.....	13
Figura 11. Métodos de imobilização de enzimas.....	14
Figura 12. Estrutura da esmectita (montmorilonita).....	18
Figura 13. Estrutura da argila montmorilonita e as possibilidades de adsorção de moléculas de enzimas.....	19
Figura 14. Imobilização de enzimas em suportes ativados com grupos glioxil.....	20
Figura 15. Estrutura do óleo de soja representada pelo seu componente majoritário (ácido linoleico) e respectivo espectro de RMN de ^1H	28
Figura 16. Estrutura da molécula do linoleato de metila, metil-éster majoritário derivado do óleo de soja e espectro de RMN de ^1H da mistura de ésteres metílicos obtida a partir da transesterificação do óleo de soja.....	29
Figura 17. Molécula do glutaraldeído.....	30
Figura 18. Estrutura do 3-aminopropiltriétoxisilano.....	31

Figura 19. Formação do <i>p</i> -NP a partir da hidrólise do éster <i>p</i> -NPP.....	31
Figura 20. Rendimento dos processos de imobilização utilizando os suportes MMT, MMT-Glu e MMT-APTES-Glu com diferentes concentrações de solução enzimática.....	36
Figura 21. Eficiência catalítica dos sistemas imobilizados MMT-Enz, MMT-Glu-Enz e MMT-APTES-Glu-Enz.....	37
Figura 22. Difrátogramas da MMT ativada (a), da MMT-APTES-Glu (b) e da MMT-APTES-Glu-Enz20 (c).....	38
Figura 23. Tipos de isotermas de adsorção.....	40
Figura 24a. Isoterma de adsorção (●) e dessorção (●) de nitrogênio para MMT.....	40
Figura 24b. Isoterma de adsorção (●) e dessorção (●) de nitrogênio para MMT-APTES-Glu.....	41
Figura 24c. Isoterma de adsorção (●) e dessorção (●) de nitrogênio para MMT-APTES-Glu-Enz20.....	41
Figura 25. Micrografias (800 X) obtidas por MEV e composição definida por EDS: (a) da MMT ativada; (b) da MMT-APTES-Glu; (c) da MMT-APTES-Glu-Enz20.....	42
Figura 26. Espectros de DRIFTS para (a) MMT e (b) MMT-APTES-Glu-Enz20.....	44
Figura 27. Curvas da análise termogravimétrica para as amostras (a) MMT; (b) MMT-APTES; (c) MMT-APTES-Glu e (d) MMT-APTES-Glu-Enz20.....	45
Figura 28. Hidrólise do azeite de oliva utilizando os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 e a enzima livre.....	48
Figura 29. Hidrólise do óleo de soja utilizando a enzima livre e os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20.....	50
Figura 30. Rendimento em éster metílico do óleo de soja utilizando a enzima livre os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20.....	52
Figura 31. Reusabilidade dos sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 nas formas (◆) adsorvida e (■) ligação covalente, realizadas através da hidrólise do <i>p</i> -NPP.....	54
Figura 32. Reusabilidade dos sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 na reação de hidrólise do azeite de oliva e do óleo de soja durante 5 ciclos consecutivos.....	55

Figura 33. . Estudo de estabilidade no armazenamento dos sistemas imobilizados MMT-Enz20, MMT-Glu-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20. Os biocatalisadores foram armazenados em tampão fosfato pH 8 e acondicionados a 4 °C..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Classificação das enzimas de acordo com a função catalítica.....	9
Tabela II. Rendimento e eficiência dos processos de imobilização e atividade específica dos sistemas suporte-enzima.....	35
Tabela III. Área superficial específica (A_{BET}), volume do poro ($V_{poro_{BJH}}$) e diâmetro do poro ($D_{poro_{BJH}}$) da argila MMT não-ativada, MMT, MMT-APTES-Glu e MMT-APTES-Glu-Enz20.....	39
Tabela IV. Perdas de massa da argila e suas modificações em função da temperatura.....	45
Tabela V. Caracterização do azeite de oliva e do óleo de soja.....	46
Tabela VI. Hidrólise do azeite de oliva utilizando a enzima na forma livre e nas formas imobilizadas.....	47
Tabela VII. Hidrólise do óleo de soja utilizando a enzima na forma livre e nas formas imobilizadas.....	49
Tabela VIII. Alcoólise enzimática do óleo de soja utilizando os biocatalisadores e a enzima livre na presença de metanol como doador acila.....	51
Tabela IX. Reações de hidrólise do p-NPP utilizando os sistemas imobilizados em 10 ciclos consecutivos.....	53
Tabela X. Acompanhamento da reutilização dos biocatalisadores nas reações de hidrólise utilizando azeite de oliva e óleo de soja como substratos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

APTES – 3-aminopropiltriétoxisilano

ASP – Ácido aspártico

BSA – Albumina de soro bovino

DG – Diglicerídeo

DRIFTS – Espectroscopia de reflectância difusa na região do infravermelho com transformada de Fourier

DRX – Difração de raios-X

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

Enz – Enzima Lipolase[®]

Glu – Glutaraldeído

GLU – Ácido glutâmico

HIS – Histidina

IA – Índice de acidez

IS – Índice de saponificação

LIS – Lisina

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MG – Monoglicerídeo

MMT – Montmorilonita ativada

MMT-APTES-Glu-Enz – Montmorilonita modificada com APTES e glutaraldeído e com enzima imobilizada

MMT-Enz – Montmorilonita ativada com enzima imobilizada

MMT-Glu-Enz – Montmorilonita modificada com glutaraldeído e com enzima imobilizada

Ms – Massa molecular média

ND – Número de duplas ligações

PET – Polietileno tereftalato

PFL – *Pseudomonas fluorescens*

p-NP – *p*-nitrofenol

p-NPP – *p*-nitrofenilpalmitato

RMN – ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

rpm – Rotações por minuto

SER – Serina

TG – Triglicerídeo

TGA – Análise termogravimétrica

TLL – *Thermomyces lanuginosus*

TMS – Tetrametilsilano

U – Unidades enzimáticas ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

UI – Atividade inicial da solução enzimática ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

US – Atividade enzimática recuperada no sobrenadante ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

UL – Atividade enzimática recuperada nas lavagens ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

Resumo

Neste trabalho foi realizado o estudo da imobilização da enzima Lipolase[®] em argila montmorilonita K10 através das metodologias de adsorção e ligação covalente. Os sistemas suporte-enzima foram caracterizados pelas técnicas de DRIFTS, UV-Vis, MEV-EDS, BET/BJH, DRX e TGA. A atividade catalítica dos biocatalisadores foi testada nas reações de hidrólise do azeite de oliva e do óleo de soja e na alcoólise do óleo de soja. Em todas as reações avaliadas, os melhores resultados foram obtidos empregando o biocatalisador MMT-APTES-Glu-Enz20 e assim, a quantidade de enzima utilizada para os experimentos foi de 20 µL. Na reação de hidrólise do azeite de oliva, o rendimento atingiu 18% em 48 horas de reação, na presença da razão óleo:água igual a 2:1 (m/m). Para o óleo de soja, o percentual de hidrólise chegou a 9% em 24 horas de reação, utilizando óleo:água na proporção de 3:1 (m/m). Nas reações de alcoólise do óleo de soja, o maior rendimento em ésteres obtido foi de 7% em 24 horas de reação, na presença da razão molar óleo:metanol igual a 1:3. A reusabilidade dos sistemas foi investigada nas reações de hidrólise. Nas reações com o azeite de oliva, o sistema MMT-Enz20 mostrou estabilidade até o quarto ciclo, enquanto o sistema MMT-APTES-Glu-Enz20 apresentou uma perda gradativa a partir do segundo ciclo de reação. Nas reações empregando o óleo de soja, o sistema MMT-Enz20 mostrou uma perda gradual desde o primeiro ciclo de reação, ao passo que o sistema MMT-APTES-Glu-Enz20 foi estável até o terceiro ciclo. A reusabilidade utilizando *p*-NPP mostrou estabilidade pelo menos por 10 ciclos. Para avaliar a estabilidade no armazenamento, os sistemas foram acondicionados em tampão fosfato e sob refrigeração, mantendo cerca de 50% da atividade catalítica após 60 dias de armazenamento.

Abstract

In this work was carried out the study of enzyme Lipolase[®] immobilization on montmorillonite K10 clay, using the adsorption and covalent bonding methods. The enzyme-support systems were characterized with the techniques: DRIFTS, UV-Vis, SEM-EDS, BET/BJH, XRD and TGA. The catalytic activity of the biocatalysts was done for hydrolysis of olive and soybean oils and for soybean oil alcoholysis. In all reactions evaluated the best results were obtained employing the biocatalyst MMT-APTES-Glu-Enz20 therefore the amount of enzyme used for immobilization was 20 μ L. For olive oil hydrolysis the yield was 18% at 48 hours reaction with the ratio oil to water of 2:1 (w/w). For soybean oil, the percentage of hydrolysis reached 9% in 24 hours of reaction using the oil:water ratio of 3:1 (w/w). For the alcoholysis of soybean oil, the higher yield of the esters obtained was 7% at 24 hours of reaction with oil:methanol ratio equal to 1:3. The reusability of systems was investigated for hydrolysis reactions. In the case of olive oil reactions, MMT-Enz20 system was stable until the fourth cycle, while the system MMT-APTES-Glu-Enz20 showed a gradual loss from the second reaction cycle. In the case of soybean oil hydrolysis, the MMT-Enz20 system showed a gradual loss from the first reaction cycle, while the system MMT-APTES-Glu-Enz20 was stable until the third cycle. Reusability on *p*-NPP showed stability for at least 10 cycles. To evaluate the storage stability, the systems were placed in phosphate buffer under refrigeration, catalytic activity of c. a. 50% remain after 60 days of storage.

1. INTRODUÇÃO

Desde o final do século XX, a população mundial está passando por um processo de conscientização ambiental, em virtude dos danos ambientais gerados através das atividades industriais e antropogênicas. Visando amenizar o comprometimento das gerações futuras, a indústria química tem buscado o desenvolvimento de processos sustentáveis, procurando o menor consumo de energia e diminuição na formação de resíduos. Dentro deste contexto, o segmento oleoquímico tem ganhado destaque, uma vez que sua principal matéria prima, os óleos vegetais, está disponível em larga escala e é produzida a partir de fontes renováveis.

Os óleos vegetais apresentam uma variedade de aplicações e fazem parte da composição de diversos produtos com alto valor agregado. Dentro das diversas modificações químicas possíveis de serem realizadas, as reações de hidrólise e alcoólise aparecem como as mais significantes, uma vez que os produtos obtidos são amplamente utilizados na indústria alimentícia e na geração de biodiesel.

Os métodos tradicionais empregados para a hidrólise e a alcoólise de óleos vegetais envolvem o uso de catalisadores inorgânicos e condições reacionais bruscas de temperatura, com formação de produtos que necessitam de uma etapa de purificação, provocando a geração de resíduos. Como uma alternativa, a área da biotecnologia conhecida como biotransformação aparece como uma alternativa à eliminação destes inconvenientes, através do uso de enzimas como catalisadores destas reações.

O emprego de enzimas como catalisadores promove altos rendimentos dos processos, menor consumo de energia devido à possibilidade de atuação em condições reacionais brandas, obtenção de produtos biodegradáveis e redução na quantidade de resíduos. Porém, o alto custo destas biomoléculas, a dificuldade na separação dos produtos e a impossibilidade de reutilização da enzima limitam a sua utilização em escala industrial. Para contornar estes problemas, a imobilização de enzimas em suportes insolúveis tem sido estudada para tornar o processo biotecnológico economicamente rentável.

As técnicas comuns de imobilização incluem adsorção física, ligação covalente e confinamento em matriz polimérica. Para ser efetivo na imobilização, o suporte deve deixar a enzima acessível ao substrato, manter a atividade catalítica por um longo período e permitir que o sistema enzima-suporte seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade catalítica. Dentro desta proposta, as argilas esmectitas constituem uma classe de catalisadores inorgânicos naturais que, devido a seu pequeno tamanho de partícula e as

propriedades de intercalação, fornecem uma considerável área superficial para adsorção em meios orgânicos e inorgânicos. Entre estas argilas, a montmorilonita figura entre as mais abundantes e tecnologicamente relevantes, uma vez que o sítio ácido presente na estrutura pode servir como centro de ligação através do grupo -NH_2 das enzimas.

Neste trabalho, estudou-se a imobilização da enzima Lipolase® em uma argila montmorilonita K10 através dos métodos de adsorção e ligação covalente, com a modificação do suporte com os agentes glutaraldeído e 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES). A atividade catalítica da enzima livre e dos sistemas imobilizados foi determinada pelo método de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato e a quantificação de proteínas totais na solução de enzima foi realizada pelo método de Bradford. O sistema suporte-enzima foi caracterizado por espectroscopia de reflectância difusa na região do infravermelho com transformada de Fourier (DRIFTS), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), área superficial específica (BET), difração de raios-X (DRX) e análise termogravimétrica (TGA). A atividade catalítica da biomolécula suportada em montmorilonita foi testada nas reações de hidrólise e alcoólise do azeite de oliva e do óleo de soja, cujos produtos foram avaliados quantitativamente por titrimetria de neutralização e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), respectivamente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os óleos vegetais pertencem a uma classe de compostos químicos conhecidos como gorduras ou lipídios. Os componentes mais expressivos na sua estrutura são os triglicerídeos ou triacilgliceróis, cujas propriedades físicas dependem da estrutura e da distribuição dos ácidos graxos presentes.¹ As diferentes funcionalidades encontradas na estrutura química dos triglicerídeos permitem uma versatilidade de modificações estruturais, que podem ser empregadas na obtenção de produtos com propriedades e finalidades específicas.² A Figura 1 mostra a estrutura de uma molécula de triglicerídeo e os sítios passíveis de modificação.

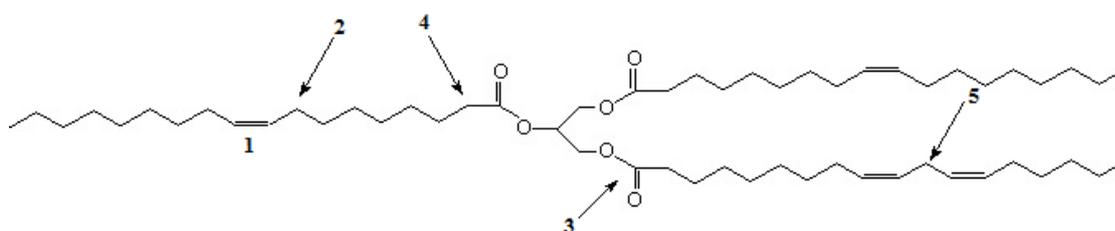


Figura 1. Molécula de um triglicerídeo e pontos suscetíveis a reações químicas: (1) dupla ligação; (2) carbono alílico; (3) grupo éster; (4) carbono α e (5) carbono dialílico.

2.1. REAÇÕES ENVOLVENDO O GRUPO CARBOXÍLICO

Dentro da química dos lipídios, as reações que convertem ácidos em ésteres ou vice-versa e as que envolvem a troca de fragmentos alcóxido são as mais utilizadas (Figura 2). Os ácidos e os ésteres graxos produzidos são precursores para a produção industrial de compostos oleoquímicos e biodiesel.³

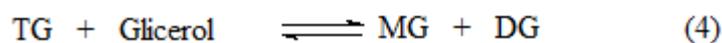
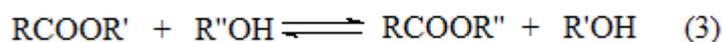
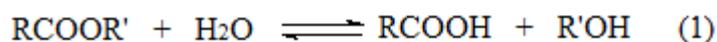


Figura 2. Reações envolvendo o grupo carboxílico: (1) hidrólise; (2) esterificação; (3) alcoólise e (4) glicerólise.

2.1.1. Hidrólise de óleos vegetais

A hidrólise representa um importante grupo de reações químicas relevante no processamento de óleos e gorduras (Figura 3). Através da reversão da ligação éster, a hidrólise é a principal reação aplicada na obtenção de ácidos graxos, que podem ser interesterificados, transesterificados ou convertidos em álcoois graxos de alto valor agregado.^{2,4}

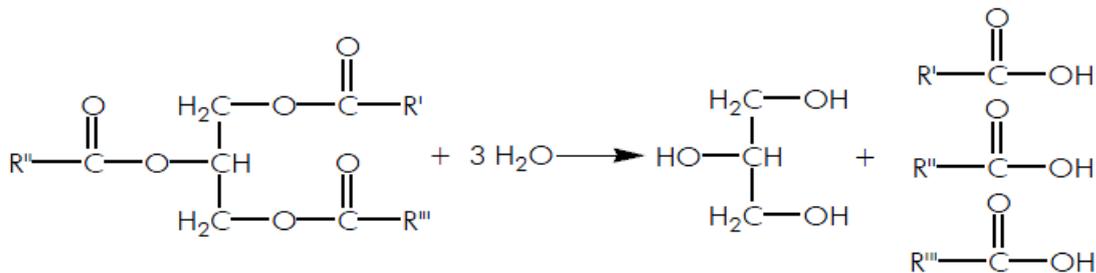


Figura 3. Hidrólise de um triglicerídeo.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos e são classificados de acordo com a cadeia carbônica em saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados, pela ausência ou presença de ligações duplas.^{5,6} São um importante grupo de compostos para a dieta humana e de outros animais e duas famílias merecem destaque pela importância na saúde humana: família ômega-6 ($\omega 6$), representada pelo ácido linoléico, e a família ômega-3 ($\omega 3$), representada pelo ácido α -linolênico (Figura 4).⁷ Esses dois tipos de ácidos graxos são denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo e, portanto, devem ser fornecidos através da dieta. Os efeitos benéficos na saúde humana envolvem a prevenção de doenças coronárias, distúrbios inflamatórios e alérgicos, como psoríase, asma e artrite reumatóide, além de possuírem papel fundamental no desenvolvimento cerebral e do sistema nervoso.^{6; 7} Óleos vegetais comuns como soja, algodão e girassol são boas fontes de ômega-6 (5-70%). A principal fonte de ômega-3 são os óleos marinhos e oleaginosas como a linhaça, que contém mais de 50% de ácido linolênico.⁶

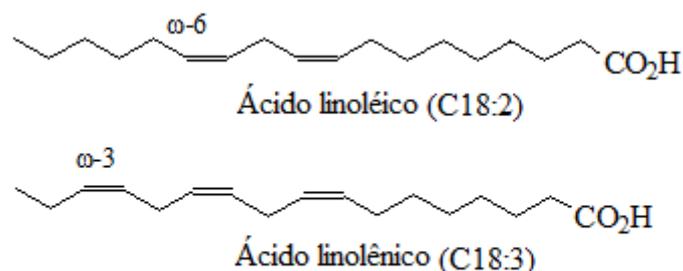


Figura 4. Estrutura dos ácidos graxos essenciais das famílias ômega-6 e ômega-3.

Embora os ácidos graxos poliinsaturados possam ser sintetizados no organismo através das reações de dessaturação e alongação (Figura 5), a ingestão direta dos metabólitos ativos tem sido investigada e se mostrado eficiente, principalmente para gestantes, idosos, lactantes e para indivíduos que possuam insuficiência da enzima Δ 6-dessaturase. Em vista disso, o mercado mundial tem disponibilizado uma variedade de suplementos alimentares encapsulados de ômega-6 e ômega-3 e produtos cujos ácidos tenham sido incorporados, como leites e derivados, formulações lácteas infantis, biscoitos, pães, massas e sucos de frutas.⁷

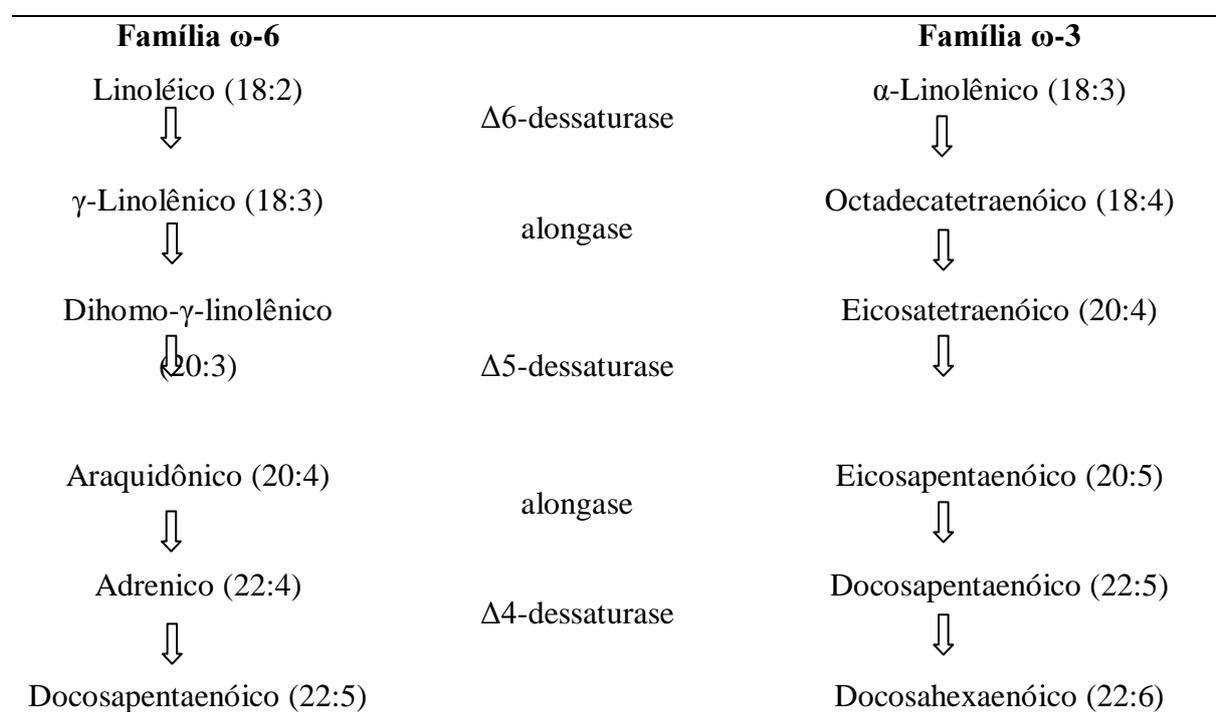


Figura 5. Metabolismo de ácidos graxos essenciais pertencentes à família ômega-3 e ômega-6.

Na indústria oleoquímica, a reação de hidrólise é conduzida na presença de catalisadores inorgânicos, sob pressões elevadas e requer temperaturas de 100 - 280 °C, obtendo-se rendimentos superiores a 97%.⁸ Os produtos resultantes são ácidos graxos escuros e uma solução aquosa rica em glicerol, que necessitam ser redestilados para remoção da cor e de subprodutos.¹

2.1.2. Alcoólise de óleos vegetais

Também conhecida como transesterificação, a alcoólise é uma importante classe de reações orgânicas e a principal rota para obtenção de ésteres alquílicos.

Nas últimas décadas, a preocupação com a escassez das reservas de petróleo e com as consequências ambientais provocadas pelo uso de combustíveis fósseis tem incentivado a busca por fontes alternativas de energia.⁹ Sendo assim, os óleos vegetais aparecem como um substituinte viável, uma vez que são provenientes de fontes renováveis de energia, podem ser produzidos em larga escala e são biodegradáveis.^{10,11} Contudo, a alta viscosidade e a baixa volatilidade destes compostos prejudica o emprego *in natura* como combustível, uma vez que provocam a formação de goma nos motores devido à oxidação, depósitos de carbono por combustão incompleta, diminuição da lubrificação pela ocorrência de polimerização e entupimento dos sistemas de injeção. Para superar estes inconvenientes, a indústria oleoquímica passou por modificações tecnológicas importantes para atingir materiais compatíveis com os motores e com características semelhantes ao diesel, chegando à produção do biodiesel.⁵

Quimicamente o biodiesel é definido como uma mistura de mono-álquil ésteres de ácidos graxos, derivados de lipídios de ocorrência natural, e que pode ser produzido através da reação de transesterificação catalítica de óleos vegetais ou gorduras animais na presença de um álcool, originando glicerina como subproduto.^{12;13}

Na reação de alcoólise, uma molécula de triglicerídeo reage com um álcool na presença de um catalisador ácido ou básico, produzindo uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol. O processo ocorre em três etapas consecutivas, com formação de diglicerídeo e monoglicerídeo como intermediários (Figura 6).¹¹

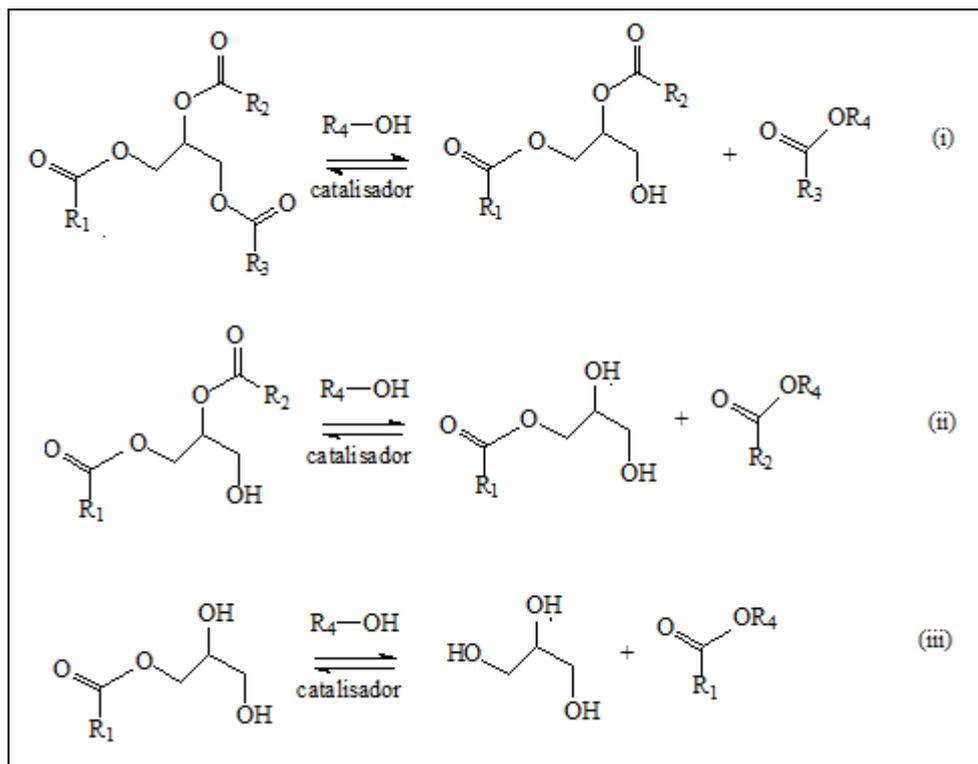


Figura 6. Reações que ocorrem na alcoólise de triglicerídeos.

O processo industrial convencional para produção de biodiesel envolve o uso de hidróxido de sódio ou de potássio como catalisador, na presença de metanol ou etanol. A metanólise é o processo mais utilizado devido a grande disponibilidade e o baixo custo do metanol. Entretanto, uma vez que se intensifica a busca por alternativas sustentáveis dentro do segmento industrial, a possibilidade de produzir etanol a partir de recursos naturais e renováveis torna a etanólise uma rota atrativa, embora o processo seja mais dispendioso e necessite de condições mais drásticas de reação, comparado ao processo na presença de metanol.¹⁴ O processo convencional é o mais eficiente, com rendimentos próximos a 100%, a taxa de reação é rápida e o custo é baixo. Contudo, óleos vegetais podem conter pequenas quantidades de água e de ácidos graxos livres, que podem reagir com o catalisador e provocar a formação de reações laterais como a saponificação, diminuindo o rendimento em ésteres e dificultando a separação do glicerol.¹²

Uma segunda alternativa para o processo industrial é a utilização de catalisadores ácidos, geralmente os ácidos sulfúrico ou sulfônico.¹⁰ Neste caso, o catalisador é menos sensível à presença de ácidos graxos na matéria-prima e a taxa de reação é ligeiramente mais lenta quando comparada ao processo alcalino. Embora o rendimento seja elevado (acima de 90%), a acidez do meio reacional pode provocar a corrosão dos equipamentos.^{10; 12}

Desconsiderando outros processos existentes, é possível afirmar que as limitações na obtenção de derivados oleoquímicos estão associadas aos tipos de catalisadores empregados, que são pouco versáteis, possuem baixa especificidade e geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminada, exigindo uma etapa posterior de purificação.¹

Neste contexto, a biotecnologia surge como uma alternativa para a modificação de óleos e gorduras através do uso de enzimas como catalisadores, uma vez que o emprego destas biomoléculas promove elevados rendimentos dos processos, menor consumo de energia, obtenção de produtos biodegradáveis e redução na quantidade de resíduos.¹

2.2. ENZIMAS

Enzimas são biocatalisadores versáteis com alta seletividade e atividade catalítica e têm sido utilizadas em biotecnologia, em processos farmacêuticos e na indústria química.¹⁵ Suas propriedades as tornam atrativas para utilização em substituição aos catalisadores químicos, das quais cabe salientar a atuação em condições reacionais brandas (pH e temperatura fisiológicos), ser biodegradável, o solvente utilizado é ambientalmente aceitável (normalmente é água) e sua alta quimiosseletividade (especificidade pelo substrato), regioseletividade (entre partes similares de uma molécula) e estereosseletividade (entre isômeros ópticos).^{16,17} Essas características possibilitam a obtenção de produtos com elevada pureza, uma vez que evitam a formação de subprodutos através de reações laterais indesejáveis.^{18,19}

As enzimas podem ser obtidas a partir de animais, vegetais e microorganismos. Entretanto, as enzimas derivadas de microorganismos são as mais utilizadas devido à grande disponibilidade, facilidade de manipulação genética e também pela capacidade dos microorganismos apresentarem rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo.¹⁸

2.2.1. Classificação das enzimas

A classificação das enzimas foi uniformizada pela União Internacional de Bioquímica, que dividiu as enzimas em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação em que atuam. A Tabela I mostra alguns exemplos de enzimas dentro desta classificação, de acordo com sua função catalítica.

Tabela I. Classificação das enzimas de acordo com a função catalítica.²⁰

Classificação	Função catalítica	Exemplos
Oxidoredutases	Reações de óxido-redução	desidrogenases, oxidases, peroxidases, hidroxilases
Transferases	Intermediam a transferência de grupos funcionais	metiltransferases, transaminases
Hidrolases	Reações hidrolíticas e clivagem de ligação éster	carbohidrases, estearases, fosfatases, lipases, proteases
Liases	Reações de eliminação pela adição de HX	Descarboxilases
Isomerases	Processos de isomerização	cis-trans isomerase, mutase
Ligases	Reações de síntese	sintetase, carboxilase

Na indústria alimentícia e de ração animal, as proteases e as carbohidrases são as mais utilizadas. Além disso, celulasas e amilases vêm sendo aplicadas na fermentação de álcool e nas indústrias têxteis e de couro.²¹ As enzimas hidrolíticas (proteases, amilases, celulasas e lipases) são as mais frequentemente utilizadas e as vantagens que as tornam uma opção atrativa são a grande disponibilidade, baixo custo e facilidade de uso porque não necessitam de cofatores.²²

2.2.2. Lipases

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases) e atuam sobre a ligação éster de diversos compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos.²³ São encontradas em tecidos animais e plantas, mas preferencialmente são produzidas por fermentação de vários microorganismos devido às facilidades de controle dos processos e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos. Além disso, as lipases derivadas de microorganismos são geralmente mais estáveis e possuem maior diversidade nas suas propriedades do que as lipases originadas de outras fontes.⁷

O sítio ativo é formado pela tríade catalítica Serina-Histidina-Ácido aspártico (ou glutâmico), que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido por uma superfície entrelaçada, denominada tampa hidrofóbica ou *lid*.²² A determinação da estrutura

tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei*, *Geotrichum candidum* e lipase pancreática humana por difração de raios-X possibilitou uma explicação para o fenômeno de ativação interfacial, onde esta tampa hidrofóbica sofre uma mudança conformacional na presença de uma interface lipídio/água, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, expondo o sítio ativo, agora acessível ao substrato (Figura 7).^{1;22}

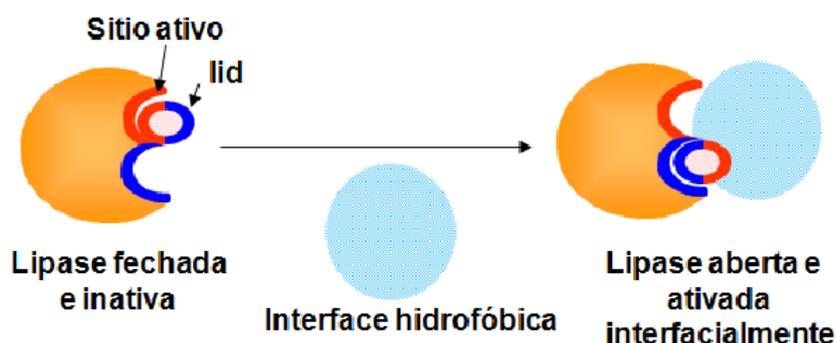


Figura 7. Mecanismo de ativação interfacial na presença de uma interface hidrofóbica.²⁴

O mecanismo de hidrólise do substrato ocorre em duas etapas. Inicialmente, a histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina que compõe o sítio catalítico. Então, ocorre o ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila ao carbono carbonílico da ligação éster do substrato, formando um intermediário tetraédrico, que é estabilizado por duas ligações de hidrogênio formadas com o grupo amida dos resíduos de aminoácidos. Assim, um álcool é liberado, deixando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada. (Figura 8).²⁵

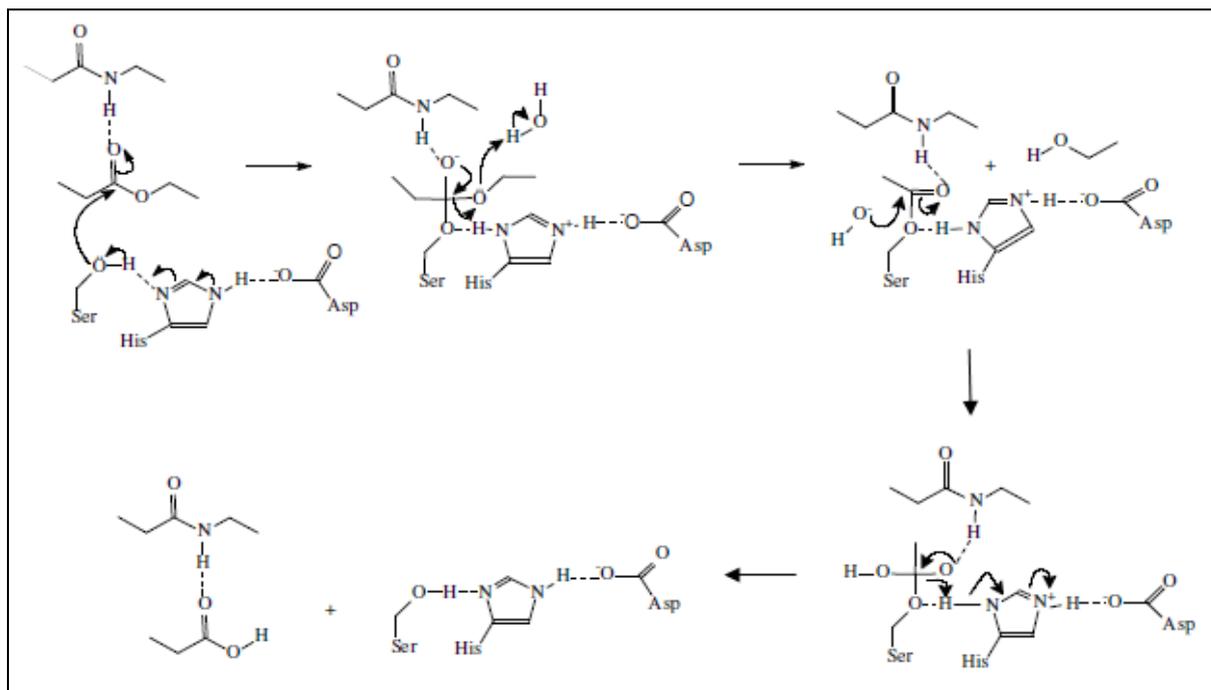


Figura 8. Mecanismo catalítico das lipases.²⁵

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), antigamente chamada de *Humicola lanuginosa*, é a enzima responsável pela atividade catalítica da Lipolase[®], comercializada pela Novozymes. Sua produção ocorre através de cepas do microorganismo *Aspergillus oryzae*. É uma proteína de cadeia simples composta por 269 aminoácidos e seu peso molecular é 31700 g/mol. Sua estrutura é praticamente na forma esférica, com uma forma central composta por folhas beta paralelas com cinco alfa-hélices interligadas. O sítio ativo inclui a típica tríade Ser-His-Asp (Figura 9).²⁶

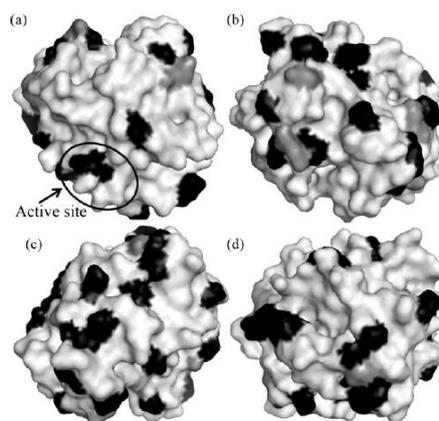
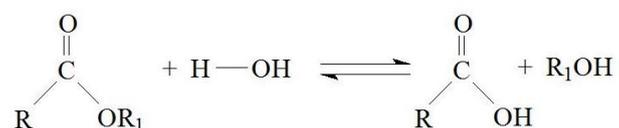


Figura 9. Distribuição dos resíduos de Lis (cinza), Asp e GLU (preto) em quatro faces da superfície da TLL. a) face frontal; b) rotação 90°; c) rotação 180° e d) rotação 270°.²⁶

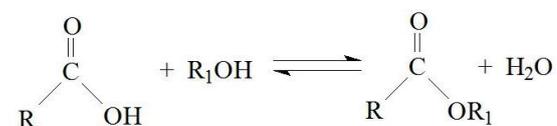
De maneira geral, as lipases tendem a formar agregados bimoleculares, confrontando o sítio ativo na sua forma aberta. A TLL possui forte propensão para formar esses agregados, o que permite que outras lipases possam ser utilizadas para purificar ou mesmo imobilizar a TLL. Isto deve ser considerado quando se avalia as propriedades da TLL, já que os monômeros e os dímeros formados possuem diferentes atividades, estabilidades e seletividades.²⁷

Além das reações da hidrólise, as lipases são capazes de realizar reações como esterificação, transesterificação (alcoólises, acidólises e interesterificação), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade da água no meio reacional é um dos fatores determinantes para cada reação (Figura 10).²⁸

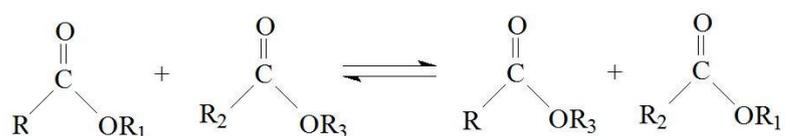
Hidrólise



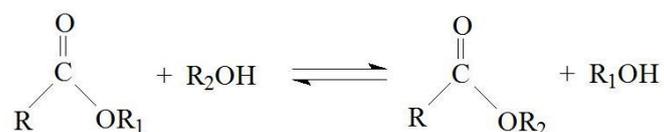
Esterificação



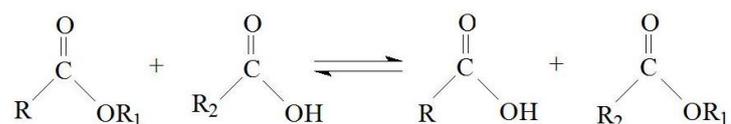
Interesterificação



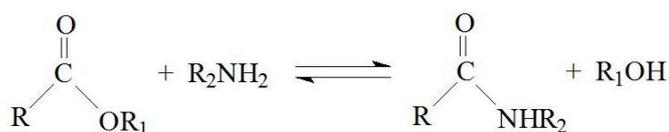
Alcoólise



Acidólise



Aminólise



Lactonização

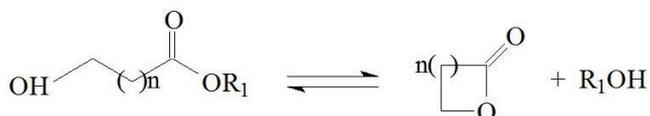


Figura 10. Reações catalisadas por lipases.

De acordo com a classificação das enzimas, as lipases são divididas em três grupos. Quanto à regioseletividade, são subdivididas em: i) lipases não-específicas, que hidrolisam ésteres de ácidos graxos liberando ácidos graxos na posição 1 (3) ou 2; ii) lipases 1,3-específicas, que hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, na posição 1 ou 3. As lipases tipo-seletivas atuam em cadeias carbônicas com tamanho e número de insaturações específicos e as enantiosseletivas na discriminação de enantiômeros no caso de substratos racêmicos.^{1; 28}

Apesar de as enzimas dotarem vantagens que as tornam uma alternativa viável para aplicações industriais, o alto custo destes biocatalisadores, a dificuldade de separação do meio reacional e a instabilidade de suas estruturas em condições extremas de pH e temperatura e também na presença de alguns solventes, são fatores que limitam o uso de enzimas em escala industrial.^{29; 30} Em vista disso, nos últimos anos o desenvolvimento de técnicas para a imobilização de enzimas em suportes sólidos tem sido importante por proporcionar maior estabilidade, melhorar a atividade catalítica, evitar a desnaturação por efeitos do meio reacional, diminuir a contaminação do produto e facilitar a separação, possibilitando a reutilização do sistema enzima-suporte em aplicações industriais.^{31; 32}

2.3. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas em suportes insolúveis é um processo onde se confina ou localiza uma enzima em uma região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e que esta possa ser reutilizada repetida e continuamente.¹³ O principal interesse em imobilizar uma enzima é possibilitar a sua reutilização nos sistemas industriais, diminuindo

assim os custos do processo, além de facilitar a remoção dos produtos, o controle operacional e minimizar a produção de efluentes.³³ Os principais inconvenientes do processo de imobilização são: possível alteração da conformação da enzima, podendo comprometer o sítio ativo; a heterogeneidade do sistema suporte-enzima, onde podem existir diferentes frações de proteína imobilizadas no suporte com variações na atividade; geralmente há perda de atividade da enzima após a imobilização e o custo do biocatalisador é maior do que a enzima na sua forma livre.³⁴

As metodologias frequentemente utilizadas para a imobilização são divididas em cinco categorias, cada uma associada às suas vantagens e desvantagens (Figura 11):³⁵

1. Adsorção não-covalente e deposição
2. Interação iônica
3. Ligação covalente
4. Ligação cruzada entre a enzima (*cross-linking*)
5. Confinamento em membranas ou géis poliméricos

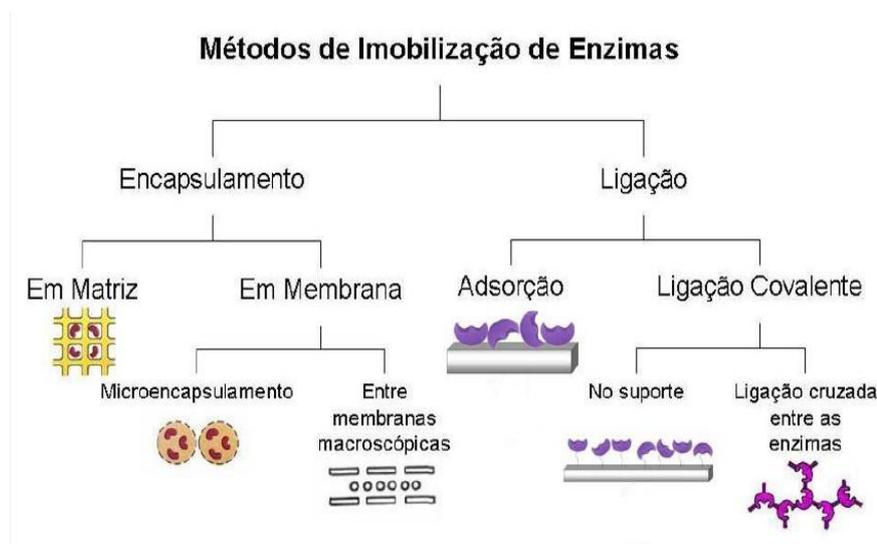


Figura 11. Métodos de imobilização de enzimas.³⁵

2.3.1. Imobilização por adsorção

A imobilização por adsorção é um dos métodos mais utilizados devido à facilidade de manipulação. A enzima é imobilizada ao suporte sólido através de ligações de baixa energia, como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, entre outras. A vantagem da utilização desta técnica é o emprego da enzima sem pré-tratamento ou qualquer

modificação química. A principal desvantagem é a lixiviação da enzima quando utilizada em meio aquoso.^{35; 36}

2.3.2. Imobilização via interação iônica

A superfície das enzimas pode estar positiva ou negativamente carregada, dependendo do pH da solução em que se trabalha e do ponto isoelétrico da enzima. A imobilização ocorre através da interação eletrostática entre as cargas opostas presentes na superfície da enzima e na superfície do suporte.³⁵

2.3.3. Imobilização por ligação covalente

Nesta técnica, a fixação da enzima ocorre através de ligações covalentes com o suporte. Grupos químicos da enzima (geralmente $-SH$, $-OH$ e $-NH_2$) interagem com grupos químicos do suporte ou de agentes bifuncionais ligados ao mesmo.³⁷ Sendo assim, a enzima é firmemente fixada ao suporte, diminuindo os efeitos de lixiviação em meio aquoso e evitando a desnaturação por alterações de pH, temperatura, presença de solventes e outros. O glutaraldeído é o agente bifuncional mais utilizado em imobilizações por ligação covalente, uma vez que possui um grupo aldeído que faz ligação com o suporte e outro que faz ligação com a enzima.³⁸ Ainda assim, é comum a utilização de agentes modificadores que funcionam como espaçadores entre o suporte e a molécula de enzima, contornando problemas relacionados ao impedimento estérico provocado pelo elevado tamanho da molécula de enzima.

Contudo, a imobilização não ocorre de uma maneira uniforme e pode ocasionar efeitos sobre a estrutura da enzima, com possível alteração na atividade catalítica devido ao comprometimento da acessibilidade do sítio ativo ao substrato, através de impedimento estérico.³¹

2.3.4. Imobilização por ligação cruzada (*cross-linking*)

Na metodologia de *cross-linking* a enzima não é fixada em um suporte. Ocorre a formação de um sistema reticulado das moléculas da enzima através de ligações covalentes na

presença de um agente ligante, originando uma rede rígida. A formação dos agregados da enzima ocorre em duas etapas, a primeira envolvendo a utilização de um agente precipitante, como acetona, etanol ou sulfato de amônia, seguida pela adição de um agente ligante, também chamado de *crosslinker*, o qual o glutaraldeído é o mais empregado. O principal inconveniente da utilização deste método é que o material resultante possui baixa estabilidade mecânica.³⁵

2.3.5. Imobilização por confinamento em membranas ou géis poliméricos

O método de encapsulamento é o mais indicado para evitar efeitos negativos na estrutura da enzima, uma vez que não há ligação entre a enzima e o suporte.³⁶ Ocorre o confinamento da molécula de enzima em uma membrana ou um polímero geliforme, que permite a difusão do substrato e dos produtos da reação. O método sol-gel é o mais utilizado, onde a rede polimérica é formada durante a imobilização, originando materiais de sílica altamente porosos e de preparação rápida. A maior desvantagem da utilização deste método está associada aos efeitos difusionais.³⁹

2.4. SUPORTES

A seleção do suporte para a imobilização da enzima deve ser baseada nas propriedades finais desejadas para o biocatalisador.³⁴ As características principais que devem ser observadas para a escolha de um suporte são: área superficial, permeabilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica adequada às condições operacionais, custo, entre outras.²²

Uma grande variedade de suportes tem sido utilizada para a imobilização de várias enzimas. Estes materiais diferem no tamanho, densidade, porosidade e forma, e podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos.⁴⁰

Dentro da classe dos suportes orgânicos encontram-se os polímeros naturais e os sintéticos. Os polímeros sintéticos possuem uma variedade de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para obtenção de um suporte ideal. Entretanto, os polímeros naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, uma vez que geralmente são de menor custo e de fácil degradação, não causando danos ao meio

ambiente.^{32; 41} Destacam-se os suportes orgânicos naturais agarose e hidrogéis de quitosana, visto pelo grande número de trabalhos publicados.^{42; 43}

No grupo de suportes inorgânicos, existem uma variedade de suportes naturais, como as argilas, ou materiais manufaturados, que incluem vidros de porosidade controlada, alumina, cerâmicas, entre outros.³⁴

Vários estudos têm mostrado que as enzimas imobilizadas em suportes inorgânicos são mais estáveis do que quando suportadas em polímeros naturais ou sintéticos. Materiais porosos possuem características que favorecem a imobilização, devido ao seu tamanho de poro, ao volume de poro e sua área de superfície.⁴⁴

O uso de filossilicatos, como as argilas esmectitas, na imobilização de enzimas tem ganhado destaque nos últimos anos. O emprego destes argilominerais apresenta inúmeras vantagens como alta área superficial específica, facilidade de dispersão de água e excelente resistência mecânica. A origem natural, o baixo custo e a facilidade de modificação destes materiais também são fatores que tornam o uso de argilas mais atrativo.⁴⁰

2.4.1. Argila montmorilonita

A argila montmorilonita tem sido amplamente utilizada como catalisador e como suporte para imobilização de enzimas. As propriedades deste argilomineral podem ser modificadas através de metodologias simples como ativação ácida, troca iônica, pilarização e intercalação com componentes orgânicos.⁴⁵

A montmorilonita pertence ao grupo das argilas esmectitas e sua estrutura é composta pela intercalação de uma camada octaédrica (Al_2O_3 ou MgO) entre duas camadas tetraédricas (SiO_2), também conhecida como estrutura T:O:T, conforme ilustrado na Figura 12. Os cátions Al^{+3} presentes na camada octaédrica podem ser substituídos por cátions Mg^{+2} ou Fe^{+2} , gerando uma carga negativa que é compensada por Na^+ ou Ca^{+2} . O espaço interlamelar pode variar e os cátions trocáveis neste espaço permitem modificações na acidez deste material.⁴⁶

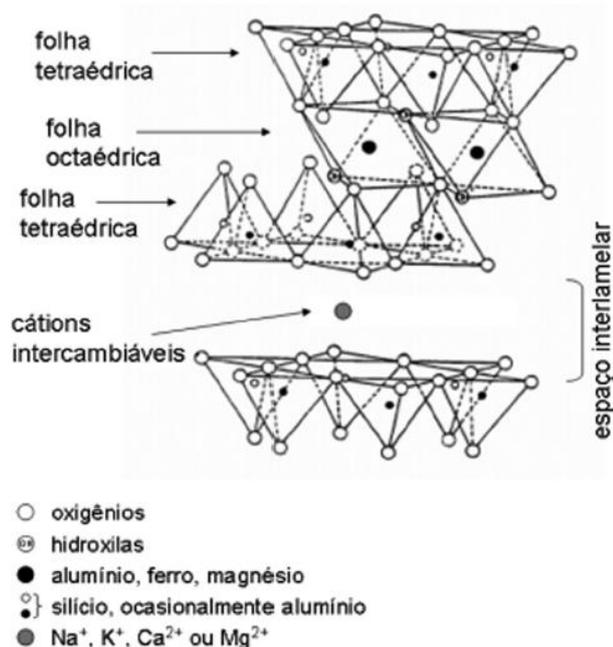


Figura 12. Estrutura da esmectita (montmorilonita).⁴⁷

A montmorilonita comercial K10 é obtida através de tratamento da montmorilonita natural com ácidos fortes e alta temperatura.⁴⁸ Este processo remove metais, elimina impurezas minerais e causa uma delaminação parcial, originando uma argila com elevada área superficial externa e com mesoporosidade permanente. Além disso, este tratamento substituiu os cátions alcalino ou alcalino-terrosos, presentes na estrutura cristalina ou como cátions trocáveis, por cátion H_3O^+ .⁴⁹ O material resultante apresenta dois sítios ácidos: sítios ácidos de Lewis, formados nas bordas das lamelas, e sítios ácidos de Brønsted nas regiões lamelares residuais, que contribuem para o intumescimento da argila na presença de solventes.⁴⁶

Devido à afinidade de argilas expansíveis para adsorção de proteínas, a imobilização de enzimas em argilominerais tem sido estudada nos últimos anos. Os sítios ácidos presentes na estrutura destes materiais podem servir como centro de ligação através do grupo $-NH_2$ das enzimas. As enzimas podem ser adsorvidas tanto na superfície externa quanto interna das lamelas das argilas.⁵⁰ A Figura 13 mostra as possíveis posições de adsorção de moléculas de enzima.

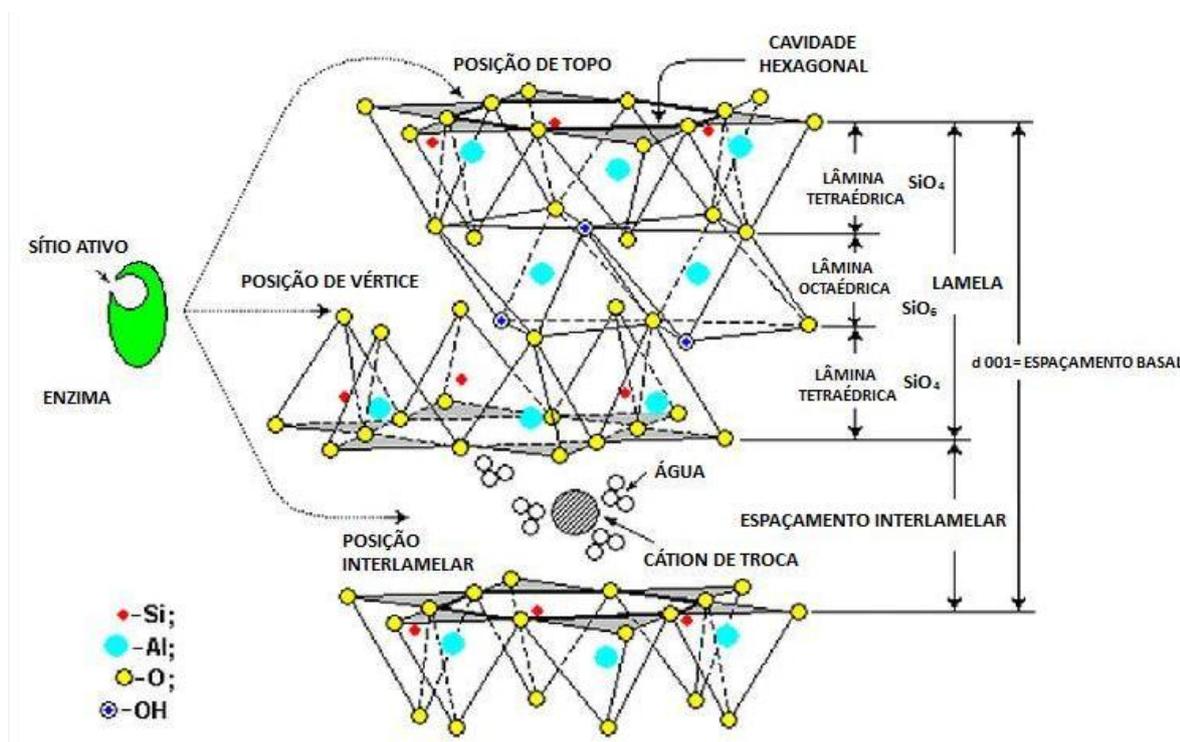


Figura 13. Estrutura da argila montmorilonita e as possibilidades de adsorção de moléculas de enzimas.³²

A superfície do suporte deve ser dotada de grupos funcionais capazes de reagir com grupos frequentemente encontrados nas proteínas. Estes grupos envolvidos na imobilização devem ser estáveis para permitir que a enzima permaneça imobilizada mesmo em longos períodos de reação.³¹ Recentemente, alguns estudos têm sido voltados para a modificação estrutural de argilas através da organofuncionalização. O processo consiste na introdução de um radical alcóxi através da interação com as hidroxilas presentes na superfície da argila. Geralmente, os silanos utilizados apresentam uma estrutura do tipo $R-SiX_3$, onde X é o grupo hidrolisável, normalmente metóxi ($-OCH_3$) ou etóxi ($-OC_2H_5$).⁵¹

O glutaraldeído é o agente modificador mais empregado na imobilização de enzimas devido à sua versatilidade e boa estabilização. Desta forma, o tratamento com glutaraldeído em suportes previamente modificados com grupos amino oferece bons resultados, uma vez que permite o *crosslink* entre as moléculas de glutaraldeído ligadas à enzima e também ligadas ao suporte.³¹ A ligação entre esses grupos ocorre através da formação de uma base de Schiff. Em pH neutro, esta ligação é muito instável, impossibilitando que a enzima fique imobilizada. Porém, em pH alcalino, os resíduos de lisina presentes nas enzimas podem interagir com o suporte, proporcionando a formação de ligação suporte-enzima de caráter

multipontual. A finalização do processo de imobilização ocorre na presença de borohidreto de sódio, que promove a redução dos grupos aldeídos que não reagiram e transforma a base de Schiff numa ligação covalente simples, que é estável e então possibilita a fixação da enzima no suporte sólido. A Figura 14 ilustra o processo de imobilização em suportes contendo grupos glioxil.

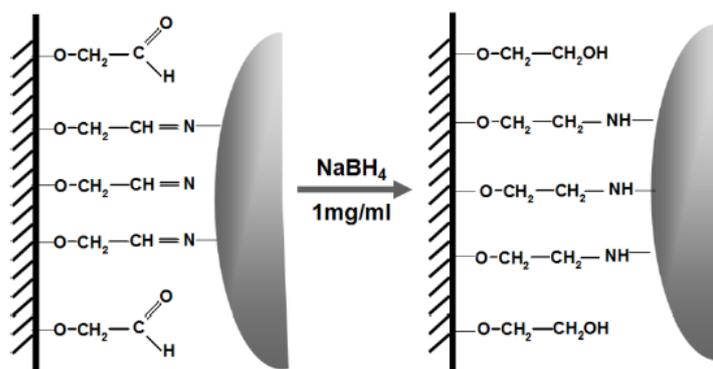


Figura 14. Imobilização de enzimas em suportes ativados com grupos glioxil.

Yiğitoğlu *et al*⁵² estudaram a imobilização da lipase de *Candida rugosa* em polietileno tereftalato (PET) modificado com acrilamida. Os grupos amida presentes no suporte foram convertidos em grupos amina através da reação de degradação de Hofmann e o material foi ativado com uma solução 2% de glutaraldeído por 18 horas. A imobilização da enzima foi realizada em pH 4, em temperatura ambiente, sob agitação em *shaker* por 18 horas. A lipase imobilizada mostrou alta taxa de hidrólise na utilização dos óleos de canola e oliva como substratos e manteve 90% da atividade inicial após 60 dias, quando estocada a 4 °C.

Castro *et al*⁵³ mostraram a imobilização das lipases de TLL e *Pseudomonas fluorescens* (PFL) em resina Toyopearl AF-amino-650M, utilizando glutaraldeído, glicidol e epiclorigidrina como agentes de ativação. A imobilização das enzimas ocorreu em temperatura ambiente, pH 10,05 e na presença de triton X-100. O biocatalisador obtido com TLL e a resina modificada com glicidol (grupos glioxil) mostraram maior atividade hidrolítica e melhor estabilidade térmica, enquanto o mesmo suporte imobilizado com PFL mostrou menores atividade e estabilidade. Contudo, na reação de transesterificação houve similar formação de éster utilizando esses dois biocatalisadores. Na síntese de biodiesel, a maior conversão foi atingida com óleo de palma, catalisada pelos derivados glioxil-TLL e glioxil-PFL.

Gopinath *et al*⁵⁴ testaram a imobilização de α -amilase, glucoamilase e invertase em argila MMT K10 através das metodologias de adsorção e ligação covalente, esta última ativando o suporte com APTES e glutaraldeído. A caracterização dos biocatalisadores mostrou que as cadeias laterais da enzima ficaram intercaladas no espaço interlamelar e mostraram atividade catalítica significativa.

2.5. BIOCATALÍSE EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS

Na natureza, as enzimas normalmente funcionam em solução aquosa. Devido a isso, a maioria dos estudos realizados com o emprego destas biomoléculas foi realizada em meio aquoso. A quantidade de água ligada à enzima está diretamente relacionada com as suas propriedades como atividade, estabilidade e especificidade, uma vez que a água participa das interações não-covalentes responsáveis pela conformação cataliticamente ativa da enzima. Portanto, pequenas variações na quantidade de água podem provocar alterações na conformação da enzima, com consequente inativação. Por outro lado, o uso de água como solvente limita algumas aplicações da biocatálise, principalmente em processos que envolvem substratos hidrofóbicos.^{44; 55}

A utilização de meios não convencionais inclui o emprego de solventes orgânicos, fluidos supercríticos e líquidos iônicos, a fim de possibilitar a solubilização de substratos hidrofóbicos, reduzindo alguns efeitos inibitórios ou tóxicos causados pelo substrato ou pelo produto da reação. A seleção do solvente deve ser realizada de forma a permitir que o mesmo atue como diluente no meio reacional, sem interferir na atividade catalítica da enzima.⁵⁵ Por outro lado, a presença de solventes orgânicos pode provocar a desnaturação ou inibição da enzima. Portanto, é necessário manter um número mínimo de moléculas de água suficientes para manter a conformação da enzima e possibilitar a atividade catalítica em meio de solvente orgânico.^{56; 57}

Gagnon *et al*^{57; 58} estudaram o efeito do solvente na atividade das lipases *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* e *Thermomyces lanuginosus*. Quinze solventes hidrofílicos e hidrofóbicos foram avaliados na metanólise do óleo de soja. Os resultados mostraram que o rendimento em ésteres foi dependente do coeficiente de partição dos solventes. Os solventes derivados de hidrocarbonetos saturados possibilitaram o maior rendimento utilizando as três enzimas, dos quais isooctano e *n*-hexano exibiram o melhor desempenho.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Imobilizar a enzima lipase comercial (Lipolase[®]) em argila montmorilonita K10 através dos métodos de adsorção e ligação covalente, para utilização como biocatalisador em reações de modificação de óleos vegetais como hidrólise e alcoólise enzimática.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver novos sistemas catalíticos: catalisadores enzimáticos heterogêneos;
- Caracterizar o biocatalisador;
- Caracterizar os produtos das reações;
- Otimizar as condições para a imobilização da enzima e para as reações de hidrólise e alcoólise enzimática;
- Avaliar a reusabilidade dos sistemas catalíticos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

Os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. Os fosfatos de sódio monobásico monohidratado p.a. (Vetec) e dibásico p.a. (Vetec) foram utilizados no preparo da solução tampão. Tris(hidroximetil)aminometano p.a. (Vetec) e triton X-100 (Vetec) foram empregados na formulação da solução emulsionante. Corante Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad Laboratories), álcool etílico p.a. (Synth) e ácido fosfórico 85% p.a. (Nuclear) foram utilizados no preparo do reagente de Bradford. A enzima Lipolase® foi adquirida da Novozymes. A argila montmorilonita K10 (MMT K10, Sigma-Aldrich) foi utilizada como suporte para imobilização da enzima. Os compostos 3-aminopropiltriétoxissilano 99% (APTES, Sigma-Aldrich) e glutaraldeído 25% (Dinâmica) foram empregados na modificação da MMT K10. O *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP, Sigma-Aldrich) foi o substrato utilizado no ensaio enzimático para determinação da atividade hidrolítica da enzima. Albumina de soro bovino (BSA, Alamar Tecno-científica) e *p*-nitrofenol standard solution 10 mM (*p*-NP, Sigma-Aldrich) foram os padrões empregados na obtenção da curva padrão das soluções de Bradford e emulsionante, respectivamente.

Os óleos vegetais foram adquiridos no comércio local: azeite de oliva extravirgem (Costa d'oro) e óleo de soja (Liza). O azeite de oliva é o substrato padrão utilizado nas reações de hidrólise enzimática e o óleo de soja foi empregado como substrato nas reações de alcoólise devido a grande disponibilidade e ao interesse comercial do produto final da reação.

Todas as reações foram realizadas em triplicata.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCATALISADORES

4.2.1. Espectroscopia de Reflectância Difusa na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFTS)

As amostras foram analisadas na forma sólida e dispersas em KBr, em temperatura ambiente. O equipamento utilizado foi IR Prestige-21 da marca Shimadzu, com acessório Easidiff da Pike Technologies. Os dados foram coletados em porcentagem de transmitância (%T) e convertidos em unidades de reflectância (Kubelka-Munk). Todos os espectros foram realizados no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.2. Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível

As análises de atividade enzimática e quantificação de proteína foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta-visível, modelo UV-1600 Spectrophotometer, fabricado pela Pró-Análise, em comprimentos de onda de 410 nm e 595 nm, respectivamente.

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

A caracterização morfológica das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com detector de elétrons secundários, marca JEOL, modelo JSM-6300F em 20 KV, acoplado a um espectrômetro de raios-X dispersivo em energia da marca Noran System Instruments EDX. As amostras foram depositadas em fita dupla face de carbono em suportes de alumínio e metalizadas com platina.

4.2.4. Área Superficial Específica (BET), Volume e Diâmetro do Poro (BJH)

A determinação da área superficial foi realizada pelo método BET (Brunauer-Emmett-Teller), em equipamento Quantachrome Autosorb Automated Gás Sorption Report. O volume e o diâmetro dos poros foram obtidos pelo método BJH (Barret, Joyner e Halenda) em instrumento Micromeritics Gemini Series. As amostras foram previamente desgaseificadas sob vácuo por 16 horas em temperatura ambiente.

4.2.5. Difração de Raios-X (DRX)

As análises de difração de raios-X foram realizadas em equipamento Siemens, com goniômetro tipo D500. A radiação $K\alpha$ empregada foi do cobre ($\lambda=0,15418$ nm), com valores de 2θ variando entre 2° e 20° .

4.2.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em equipamento SDTQ600, de

25 a 800 °C sob fluxo de nitrogênio (100 mL min⁻¹) e de 800 a 1000 °C sob fluxo de ar sintético (100 mL min⁻¹), empregando uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

4.2.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹H)

Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos em instrumento VARIAN, modelo INOVA 300 MHz, empregando tetrametilsilano (TMS) como referência. Aproximadamente 60 mg de amostra foram solubilizadas em 0,6 mL de clorofórmio deuterado (CDCl₃). Para 32 repetições, o tempo total para obtenção dos espectros foi de 6 min e 49 s. O pulso aplicado foi de 7,5 μs, correspondente ao ângulo de nutação 71,1°, largura espectral de 4799,3 Hz e 65536 pontos utilizados durante a aquisição.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

4.3.1. Índice de Iodo

A determinação do índice de iodo foi realizada de acordo com ABNT NBR 9231:2002.⁵⁹ Em erlenmeyer de 500 mL com tampa, pesar cerca de 0,3 g de amostra. Adicionar 15 mL de clorofórmio p.a. e volumetricamente 25 mL de solução de Wijs e deixar a mistura em repouso por 1 h a 20 °C. Seguir acrescentando 150 mL de água destilada e 20 mL de solução de iodato de potássio 10% e titular a amostra com solução padrão de tiosulfato de sódio 0,1 M até coloração amarela. Adicionar 3 mL de solução de amido 1% como indicador e continuar a titulação até que o sistema permaneça incolor.

O índice de iodo define o número de ligações insaturadas em substâncias graxas. É expresso em g de iodo por 100 g de amostra e calculado conforme a Equação 1.

$$\text{Índice de iodo} = \frac{126,9 \times M \times (V_b - V_a)}{10 \times m} \quad (1)$$

Onde:

126,9 é a massa molar do iodo (g), **M** é a molaridade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (mol L^{-1}), **V_b** é o volume gasto na determinação em branco (mL), **V_a** é o volume titulado com a amostra (mL) e **m** é a massa de amostra (g).

4.3.2. Índice de Acidez

O índice de acidez foi determinado de acordo com a norma ABNT NBR 11115:1998.⁶⁰ Pesar aproximadamente 7 g de amostra em erlenmeyer e acrescentar 100 mL de etanol p.a. neutralizado. Aquecer o sistema até solubilização completa da amostra. Ainda quente, adicionar 5 gotas de fenolftaleína como indicador e titular o conteúdo de ácidos graxos livres com solução padrão de KOH etanólica 0,1 M, até coloração rósea persistente por, no mínimo, 10 segundos.

O índice de acidez é expresso em mg de KOH por g de óleo e foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \times M \times 56,1}{m} \quad (2)$$

Onde:

M é a molaridade da solução de KOH (mol L^{-1}), **V** é o volume titulado com a amostra (mL) e **m** é a massa de amostra (g).

4.3.3. Índice de Saponificação

A determinação do índice de saponificação foi realizada conforme descrito em AOCS (Cd 3-25).⁶¹ Pesar entre 2 a 5 g de amostra em um balão de fundo redondo. Adicionar 50 mL de solução de KOH alcoólico 1% e manter o sistema em refluxo por 30 minutos. Titular o conteúdo de base remanescente com solução padrão de HCl $0,75 \text{ mol L}^{-1}$ até desaparecimento da coloração rosa.

O índice de saponificação é calculado conforme a Equação 3 e é expresso em mg de KOH por g de amostra.

$$\text{Índice de saponificação} = \frac{56,1 \times M \times (V_b - V_a)}{m} \quad (3)$$

Onde:

M é a concentração da solução de HCl (mol L^{-1}), **V_b** é o volume gasto na determinação em branco (mL), **V_a** é o volume titulado com a amostra (mL) e **m** é a massa de amostra (g).

4.3.4. Determinação da massa molar média e do número de ligações duplas do azeite de oliva e do óleo de soja

A massa molar média dos substratos foi calculada de acordo com a Equação 4, baseada no espectro de RMN de ^1H obtido nas condições descritas no item 4.2.7.

$$\begin{aligned} \mathbf{M_s} = & 15,034\mathbf{H}/3(\mathbf{B}/4) + 14,026(\mathbf{C} + \mathbf{D} + \mathbf{E} + \mathbf{F} + \mathbf{G})/2(\mathbf{B}/4) + & (4) \\ & 26,016[\mathbf{A} - (\mathbf{B}/4)]/2(\mathbf{B}/4) + 173,1 \end{aligned}$$

A Figura 15 apresenta o espectro e a representação da molécula do óleo de soja, através do componente majoritário (ácido linoléico), e a relação dos hidrogênios, onde:

- **A** são os hidrogênios ligados aos carbonos contendo ligação dupla entre si e ligado ao carbono terciário do glicerol;
- **B** são os hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos do glicerol;
- **C** são os hidrogênios dos carbonos metilênicos entre carbonos que fazem ligação dupla entre si e **E** aqueles que estão ligados aos carbonos metilênicos laterais aos carbonos de dupla ligação;
- **D** e **F** são os hidrogênios ligados aos carbonos α e β -carbonílico, respectivamente;
- **G** são os hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos de cadeia longa e **H** ligados à metila terminal.

O número de ligações duplas do óleo de soja foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$\text{ND} = \frac{(4\mathbf{A}) - \mathbf{B}}{2\mathbf{B}} \quad (5)$$

O termo $\mathbf{B}/4$ é chamado de fator de normalização e representa a área relativa a um hidrogênio. É calculado a partir da área dos quatro hidrogênios dos grupos metilenos do glicerol (**B** da Figura 15) e pode ser utilizado quantitativamente, uma vez que as modificações da molécula não ocorrem neste grupo e o sinal não sofre interferência de outros sinais.⁶²

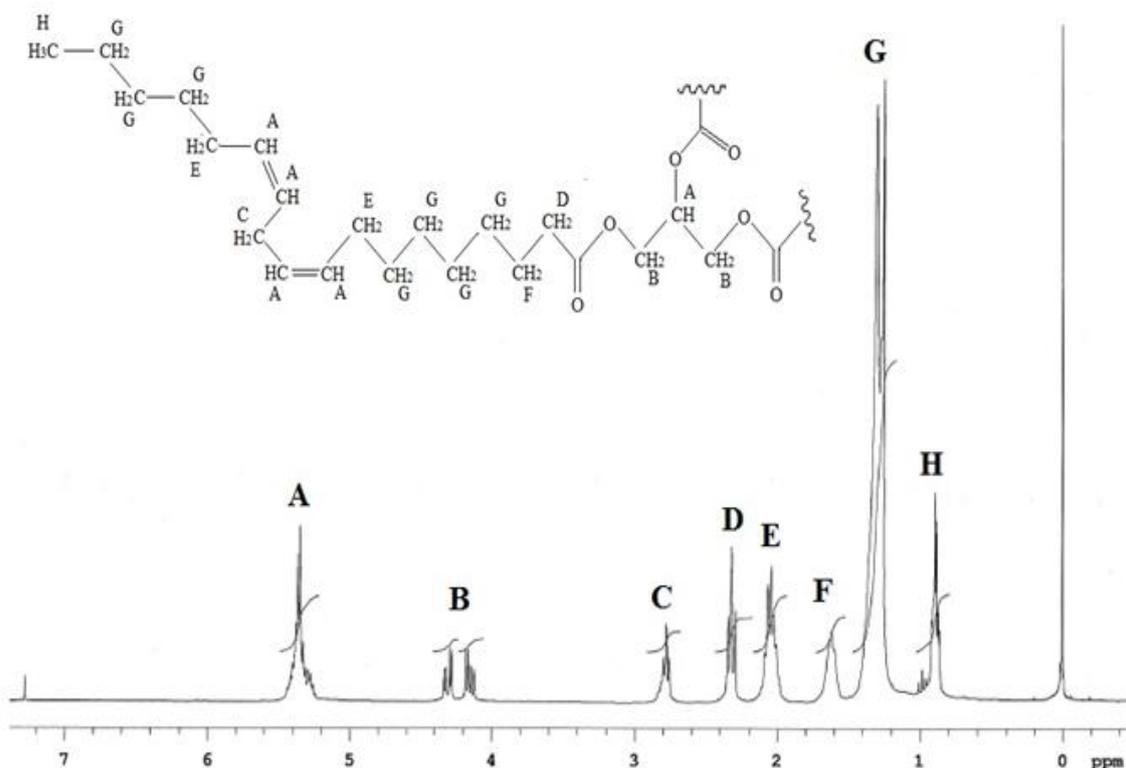


Figura 15. Estrutura do óleo de soja representada pelo seu componente majoritário (ácido linoleico) e respectivo espectro de RMN de ¹H.

4.4. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO EM ÉSTERES

A reação de alcoólise enzimática provoca alteração da estrutura do óleo na região do glicerol. Desta forma, há tendência da diminuição do sinal dos hidrogênios A e B, representados na Figura 15, e o surgimento do sinal indicado pelo hidrogênio I (Figura 16), relacionado à formação dos ésteres metílicos, também mostrados na Figura 16.

O rendimento dos ésteres metílicos pode ser calculado através da análise das áreas integradas do espectro de RMN de ¹H do produto da reação, de acordo com a relação entre os hidrogênios do grupo metileno α -carbonílico (D Figuras 15 e 16, $\delta = 2,3$ ppm) e os hidrogênios do grupo metóxi (I Figura 16, $\delta = 3,7$ ppm).

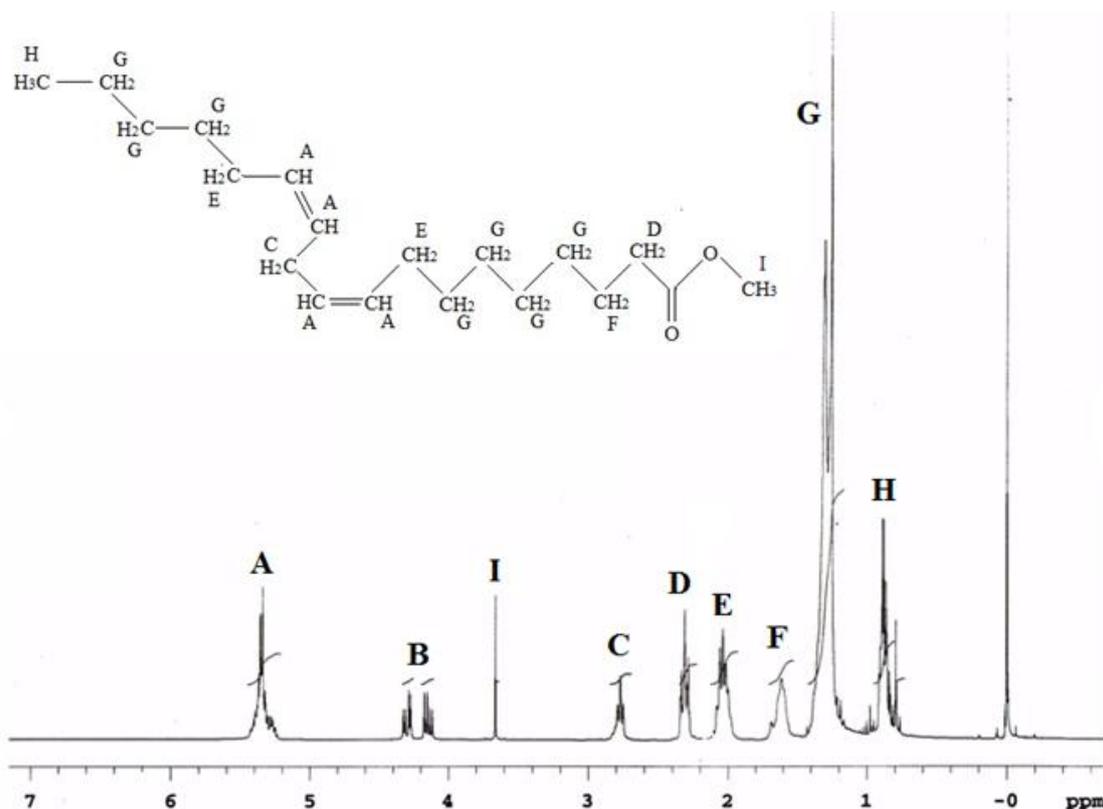


Figura 16. Estrutura da molécula do linoleato de metila, metil-éster majoritário derivado do óleo de soja e espectro de RMN de ¹H da mistura de ésteres metílicos obtida a partir da transesterificação do óleo de soja.

Enquanto os hidrogênios I são característicos dos espectros com formação de ésteres metílicos, os hidrogênios D estão presentes nas moléculas de triglicerídeo, de monoglicerídeo, de diglicerídeos e de ésteres metílicos correspondentes.⁶³ Desta forma, os hidrogênios D podem ser utilizados como fator de normalização na quantificação do produto deste tipo de reação e a conversão calculada de acordo com a Equação 6.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{100 (2I)}{3D} \quad (6)$$

4.5. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LIPOLASE[®] NA ARGILA MMT K10

A argila foi previamente mantida sob agitação vigorosa com água deionizada durante 6 horas. Após filtração em vidro sinterizado, o material foi seco em estufa por 12 horas a 120 °C e calcinado em mufla a 350 °C durante 12 horas.⁶⁴

4.5.1. Imobilização pelo método de adsorção

Para a imobilização da enzima, foi adicionado 1 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ (pH 8,0) a 100 mg de argila calcinada, seguido por 20 µL de solução de Lipolase[®]. A mistura foi mantida sob agitação a 120 rpm, a 37 °C, durante 24 horas.

4.5.2. Imobilização pelo método de ligação covalente

4.5.2.1. Tratamento da MMT K10 com glutaraldeído

A argila calcinada foi colocada em contato com solução aquosa de glutaraldeído (Figura 17) 2,5% (v/v), sob agitação constante, durante 30 minutos. O material foi lavado com água deionizada para remover o excesso de glutaraldeído e então o procedimento de imobilização foi realizado como descrito para o método de adsorção no item 4.5.1. Para remover as moléculas de enzima que possam ter sido adsorvidas e não ligadas covalentemente ao suporte, o material foi lavado com solução 1 mol L⁻¹ de cloreto de sódio.

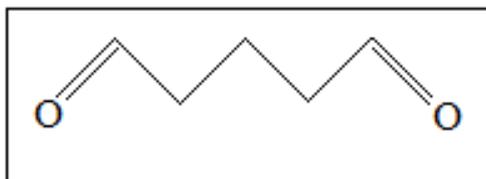


Figura 17. Molécula do glutaraldeído.

4.5.2.2 Modificação da MMT K10 com APTES e glutaraldeído

A argila calcinada foi misturada com solução de APTES (agente espaçador - Figura 18) em acetona 10% (v/v), na proporção de 10 mL de solução para 1 g de argila, e agitada em *shaker* por 3 horas. O material foi filtrado através de vidro sinterizado, lavado com acetona até que o filtrado permanecesse límpido e seco em estufa a 80 °C por 12 horas. A argila então foi tratada com solução aquosa de glutaraldeído 10% (v/v), na mesma proporção descrita no item 4.5.2.1 e agitada em *shaker* por 3 horas. O suporte foi filtrado e lavado com água deionizada para retirar o excesso de glutaraldeído e seco a 60 °C por 12 horas. O procedimento para imobilização foi o mesmo descrito para o método de adsorção no item 4.5.1.⁶⁴ As moléculas de enzima adsorvidas ao suporte foram removidas através da lavagem com solução 1 mol.L⁻¹ de cloreto de sódio.

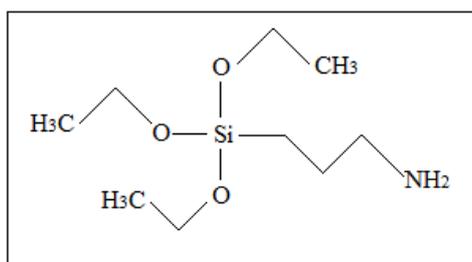


Figura 18. Estrutura do 3-aminopropiltriétoxissilano.

4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após a imobilização, o sistema suporte-enzima foi centrifugado e lavado com solução tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 8,0). Este processo foi repetido três vezes. Os sobrenadantes foram utilizados para avaliação da atividade enzimática e quantidade de proteína perdidas durante o processo de imobilização. A atividade catalítica foi determinada através do método de hidrólise do *p*-NPP (Figura 19), cujo produto formado é o *p*-nitrofenol (*p*-NP), que apresenta absorção em 410 nm.

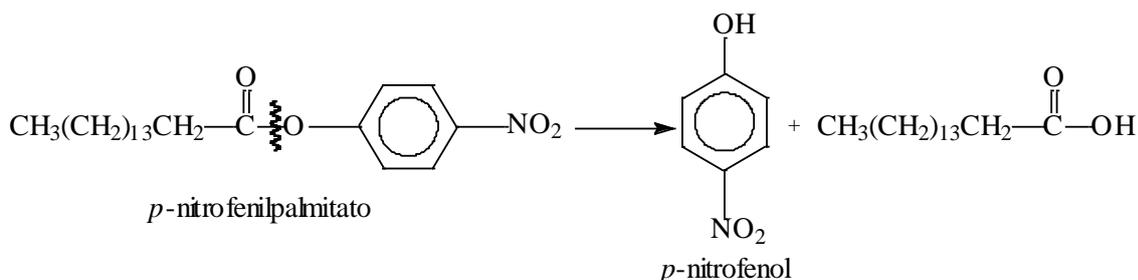


Figura 19. Formação do *p*-NP a partir da hidrólise do éster *p*-NPP.

Para a determinação da atividade hidrolítica, 100 µL de solução de enzima livre e dos sobrenadantes foram adicionados a 900 µL de emulsão, composta por 90% de solução emulsionante (0,444 g de triton X-100 dissolvidos em 100 mL de tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0) e 10% de substrato (3 mg/mL de *p*-NPP em isopropanol). As amostras foram mantidas a 37 °C em banho termostaticado por 30 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de *p*-NP por minuto de reação.⁶⁵

O rendimento do processo de imobilização foi determinado de acordo com a atividade inicial da solução enzimática (UI) e a atividade recuperada no sobrenadante (US) e nas lavagens (UL), conforme a Equação 7.

$$\text{Rendimento: } \frac{UI - (US + UL)}{UI} \times 100 \quad (7)$$

A eficiência foi avaliada através da atividade catalítica medida diretamente no suporte, em relação às atividades aplicada (UI) e recuperada no processo (US + UL), de acordo com a Equação 8.

$$\text{Eficiência: } \frac{\text{Atividade no suporte}}{UI - (US + UL)} \times 100 \quad (8)$$

4.7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O método de Bradford utiliza o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e é baseado na interação entre o corante e os aminoácidos das cadeias laterais das proteínas. No pH da reação, essa interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, de coloração azul, que absorve fortemente em 595 nm.⁶⁶ Para o preparo do reagente, 0,1 g do corante foram dissolvidos em 50 mL de etanol 95%, sob agitação constante, seguido pela adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água deionizada. Após a filtração da

solução em papel filtro qualitativo, foi realizada uma curva padrão utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão de proteína.

Para determinação da quantidade de proteína, 20 µL de amostra foram acrescentados em tubos de ensaio, seguidos pela adição de 1 mL do reagente de Bradford. Após o intervalo de 30 minutos, as absorvâncias foram analisadas em espectrofotômetro a 595 nm.⁶⁷

4.8. ESTUDO DE ESTABILIDADE NO ARMAZENAMENTO

Os sistemas imobilizados foram acondicionados e estocados sob refrigeração a 4 °C, em solução tampão fosfato pH 8,0. As amostras foram centrifugadas e submetidas ao ensaio de atividade enzimática, conforme descrito no item 4.6. O acompanhamento das atividades catalíticas foi realizado no período de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 60 dias.

4.9. REAÇÕES DE HIDRÓLISE

As reações de hidrólise dos óleos vegetais foram realizadas de acordo com Li e Wu.⁶⁸ Em frascos erlenmeyer de 125 mL, foram pesados cerca de 2 g de amostra e emulsionados durante 30 min a 37 °C com 1 mL de solução tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0. A quantidade definida de biocatalisador (100 mg) foi acrescentada e o sistema mantido sob agitação em *shaker* (120 rpm), a 37 °C, durante 1, 6, 24 e 48 horas. Para interromper a reação, 10 mL de uma solução 1:1 de acetona e etanol foram adicionados e a quantidade de ácidos graxos produzidos durante a reação foi determinada titrimetricamente com solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹, na presença de fenolftaleína como indicador.

Para avaliar o efeito da quantidade de água presente no sistema, testou-se a relação óleo:água igual a 3:1 (m/m), nas mesmas condições descritas acima. As reações foram acompanhadas no intervalo de 24 horas.^{4; 69; 70}

A porcentagem de hidrólise foi calculada relacionada aos índices de saponificação e de acidez dos óleos, conforme a Equação 9.⁷¹

$$\% \text{ hidrólise} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 56,1 \times 100}{(IS - IA) \times m} \quad (9)$$

Onde:

M é a concentração da solução de NaOH (mol L^{-1}), **V_a** é o volume gasto na titulação da amostra (mL), **V_b** é o volume gasto na titulação em branco (mL), **IS** é o índice de saponificação, **IA** é o índice de acidez e **m** é a massa da amostra (g).

4.10. REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA

As reações de alcoólise enzimática foram realizadas de acordo com Schneider 2003.⁷² Em frascos erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 1 mmol de óleo (~ 0,8 g), 3 mmol de metanol (140 μL), 8,3 mmol de água (150 μL), 100 mg de enzima imobilizada e 40 mL de hexano. O sistema foi colocado em *shaker* a 37 °C, com rotação de 200 rpm, e a reação foi acompanhada nos tempos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Após estes intervalos, a amostra foi filtrada através de vidro sinterizado para recuperação do biocatalisador. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório e o produto foi analisado por RMN de ¹H.

As mesmas reações foram conduzidas com o aumento da concentração de metanol, com razões óleo:metanol iguais a 1:4 e 1:6, esta última com adição do metanol em três etapas (1/3 no tempo zero, 1/3 após 30 min e 1/3 após 1h do início da reação). Os processos foram acompanhados no período de 24 horas.^{10; 11; 73}

4.11. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OPERACIONAL

A reusabilidade dos sistemas imobilizados foi avaliada através da hidrólise do *p*-NPP (item 4.6). Para cada reação, as amostras foram submetidas ao ensaio de atividade enzimática e centrifugadas. O biocatalisador separado foi lavado com tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 8) e novamente utilizado para a reação com o substrato na mesma concentração. 10 ciclos consecutivos foram realizados.

Os testes também foram determinados na hidrólise do azeite de oliva e do óleo de soja, de acordo com o procedimento descrito na seção 4.9. A relação óleo:água utilizada foi 2:1 (m/m). A cada 24 horas de reação, o biocatalisador foi removido através de filtração em vidro sinterizado, lavado com tampão fosfato 0,05 mol L^{-1} (pH 8,0) e reutilizado em uma nova reação com o substrato na mesma concentração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscando avaliar a eficiência das modificações realizadas no suporte e o comportamento catalítico dos sistemas obtidos neste trabalho, a seguir serão descritos os resultados obtidos através de diversas ferramentas para o entendimento dos processos realizados. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA IMOBILIZADO

Conforme descrito anteriormente, a atividade catalítica da enzima livre e dos biocatalisadores foi determinada pelo método de hidrólise do *p*-NPP e a quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford.

A Tabela II mostra os resultados obtidos para a enzima livre e os sistemas imobilizados, avaliando o efeito da concentração de solução enzimática aplicada no processo de imobilização. As amostras imobilizadas através do método de adsorção foram denominadas MMT-Enz e aquelas imobilizadas pelo método de ligação covalente foram chamadas de MMT-Glu-Enz e de MMT-APTES-Glu-Enz. Os volumes de solução enzimática utilizados foram 20 μ L, 40 μ L e 80 μ L. A atividade catalítica da solução enzimática é de 32,6 U/mL e a quantidade de proteína é de 25 mg/mL.

Tabela II. Rendimento e eficiência dos processos de imobilização e atividade específica dos sistemas suporte-enzima.

Suporte	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade específica (U/mg) ¹
Lipolase® livre	-	-	1,30
MMT-Enz20	93	16	0,35
MMT-Enz40	49	22	0,27
MMT-Enz80	68	13	0,53
MMT-Glu-Enz20	88	38	0,92
MMT-Glu-Enz40	76	22	0,32
MMT-Glu-Enz80	76	12	0,20
MMT-APTES-Glu-Enz20	93	25	0,52
MMT-APTES-Glu-Enz40	83	19	0,40
MMT-APTES-Glu-Enz80	70	14	0,20

¹ Unidades enzimáticas (μ mol min⁻¹) por miligrama de proteína.

De acordo com os dados da tabela, observa-se que os sistemas MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 apresentaram os maiores rendimentos no processo de imobilização. Comparativamente, são listados na ordem decrescente de rendimento como: MMT-Enz20 = MMT-APTES-Glu-Enz20 > MMT-Glu-Enz20. Porém, o sistema que mostrou maior eficiência em atividade catalítica foi MMT-Glu-Enz20, seguido por MMT-APTES-Glu-Enz20 > MMT-Enz20.

Como forma de facilitar a visualização dos resultados obtidos, as Figuras 20 e 21 ilustram o desempenho para o rendimento e a eficiência dos processos, respectivamente, durante a avaliação da quantidade de solução enzimática disponibilizada para a imobilização.

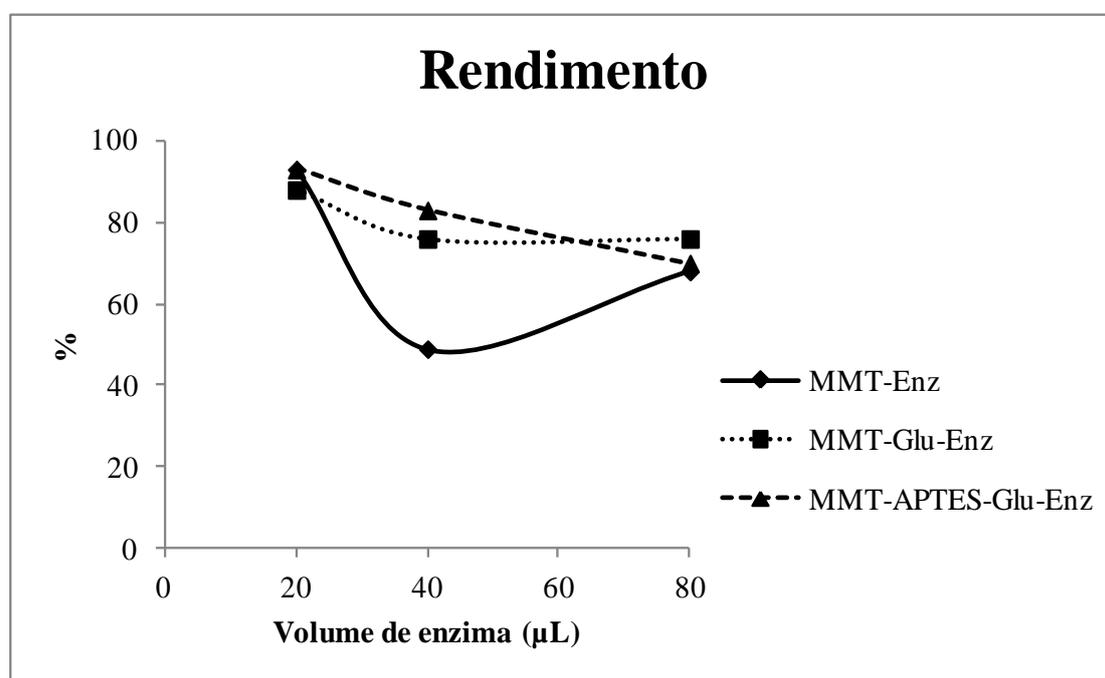


Figura 20. Rendimento dos processos de imobilização utilizando os suportes MMT, MMT-Glu e MMT-APTES-Glu com diferentes concentrações de solução enzimática.

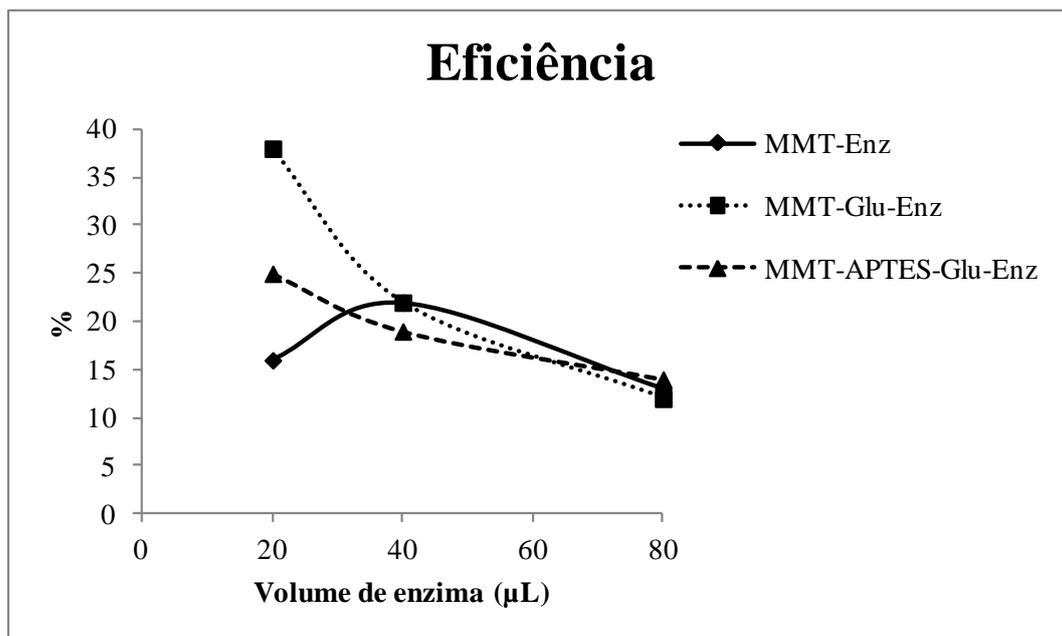


Figura 21. Eficiência catalítica dos sistemas imobilizados MMT-Enz, MMT-Glu-Enz e MMT-APTES-Glu-Enz.

Para todos os casos estudados, os dados mostram que os maiores rendimentos na imobilização da enzima (cerca de 90%) foram alcançados quando 20 μL de solução enzimática foram aplicados no processo. Para o sistema MMT-Enz, o aumento da quantidade de enzima disponível para imobilização para 80 μL provocou um aumento na atividade específica, provavelmente pelo acúmulo de camadas de enzima adsorvidas ao suporte. Contudo, grande parte da atividade catalítica da enzima foi perdida no processo de imobilização, uma vez que o rendimento diminuiu. Para o biocatalisador MMT-Glu-Enz, o aumento da quantidade de enzima praticamente não influenciou a atividade catalítica e houve pouca variação no rendimento do processo. Porém, como a quantidade de proteína imobilizada foi bastante significativa, a atividade específica foi bastante inferior, uma vez que a atividade do sistema não aumentou na mesma proporção. Por último, para o material MMT-APTES-Glu-Enz, o acréscimo do volume de solução enzimática provocou um pequeno aumento da atividade catalítica do sistema, mas um decréscimo no rendimento e na eficiência do processo. A diminuição da atividade específica foi bastante significativa, já que a atividade do sistema não foi proporcional ao aumento da quantidade de proteína imobilizada.

De acordo com esses resultados, a quantidade ideal de solução enzimática definida para utilização nos ensaios foi de 20 μL . Aparentemente, uma menor concentração de enzima proporciona uma melhor distribuição das moléculas na superfície do suporte, facilitando o

contato com o substrato. O biocatalisador MMT-Enz20 manteve cerca de 27% da atividade específica em relação à enzima livre, enquanto os sistemas MMT-Glu-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 suportaram 70% e 40%, respectivamente.

A análise por DRX permite avaliar possíveis modificações na estrutura da argila. Os difratogramas da MMT, da MMT-APTES-Glu e da MMT-APTES-Glu-Enz20, indicados na Figura 22, mostram que não há alteração na estrutura da argila quando esta é submetida às modificações com o organosilano, com o agente bifuncional e também na presença da enzima. O espaçamento interlamelar (d_{001}) é mantido e os valores encontrados foram de 2θ igual a $8,85^\circ$ que, de acordo com a Lei de Bragg, resulta em aproximadamente 10 \AA .

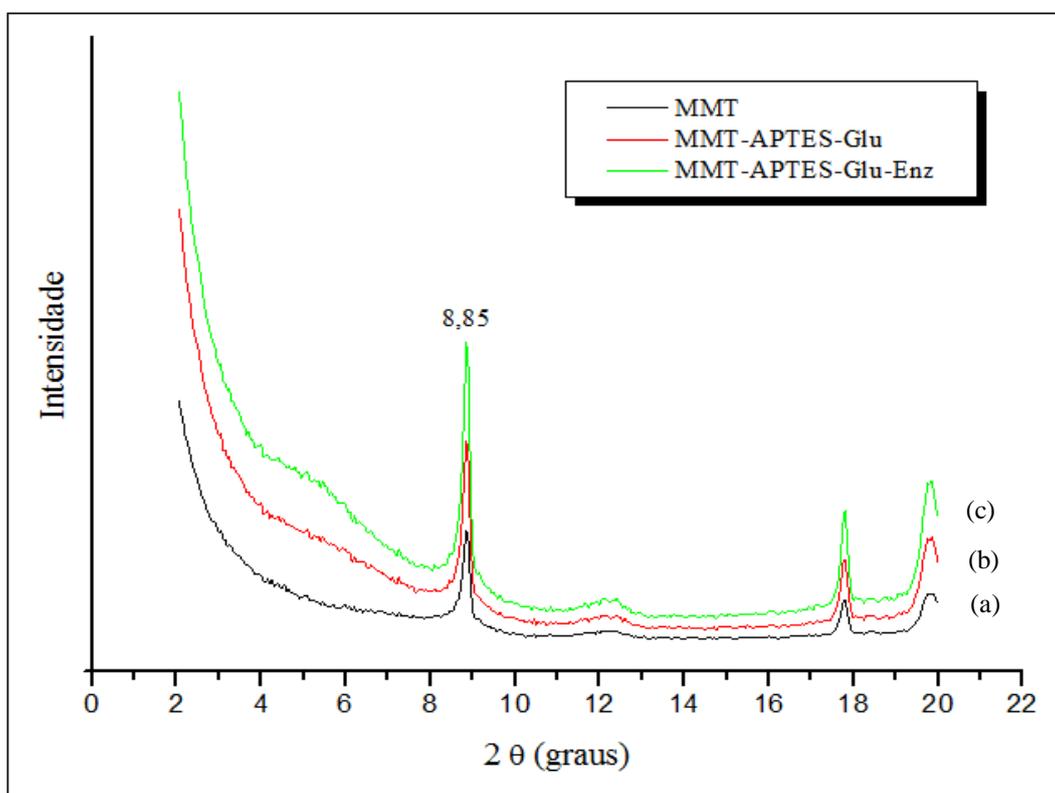


Figura 22. Difratogramas da MMT ativada (a), da MMT-APTES-Glu (b) e da MMT-APTES-Glu-Enz20 (c).

Uma das metodologias mais comuns para a determinação da área superficial e a dimensão dos poros de um sólido envolve a quantidade de adsorbato necessária para recobrir com uma monocamada a superfície de um adsorvente. Usualmente, os adsorbatos são gases e a quantidade de gás adsorvida é função da interação entre este gás e o sólido e, portanto,

sendo dependente da natureza destas espécies. Neste processo, quando um sólido é exposto a um gás num sistema fechado e a temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, culminando no aumento da massa do sólido e na diminuição da pressão do gás, até determinado tempo onde estes parâmetros adquirem valores constantes.⁷⁴

A avaliação da área superficial específica (A_{BET}), volume e diâmetro dos poros são mostrados na Tabela III. As áreas obtidas através da adsorção de N_2 mostram que ocorre um decréscimo de 196 para 73 $m^2 g^{-1}$ com a funcionalização do material com APTES e glutaraldeído e de 73 para 67 $m^2 g^{-1}$ com a imobilização da enzima. Os dados também mostram uma diminuição no volume do poro, que varia de 0,229 a 0,126 $cm^3 g^{-1}$, provavelmente provocada pelo preenchimento dos poros pelas moléculas dos agentes funcionalizantes e também por parte da molécula da enzima. Como consequência da diminuição do volume do poro, é possível observar o aumento do diâmetro. Em vista disto, estes dados corroboram a conclusão de que há modificação da argila com os agentes funcionalizantes.

Tabela III. Área superficial específica (A_{BET}), volume do poro ($V_{poro\ BJH}$) e diâmetro do poro ($D_{poro\ BJH}$) da argila MMT não-ativada, MMT, MMT-APTES-Glu e MMT-APTES-Glu-Enz20.

Composto	A_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	$V_{poro\ BJH}$ ($cm^3 g^{-1}$)	$D_{poro\ BJH}$ (Å)
MMT não-ativada ¹	201	0,251	<i>n.i.</i> ²
MMT	196	0,229	65
MMT-APTES-Glu	73	0,148	81
MMT-APTES-Glu-Enz20	67	0,126	75

¹ Dados obtidos pelo fabricante.

² não informado.

O estudo de vários resultados experimentais permitiu a classificação das isotermas de adsorção em seis tipos característicos, mostrados na Figura 23.⁷⁵

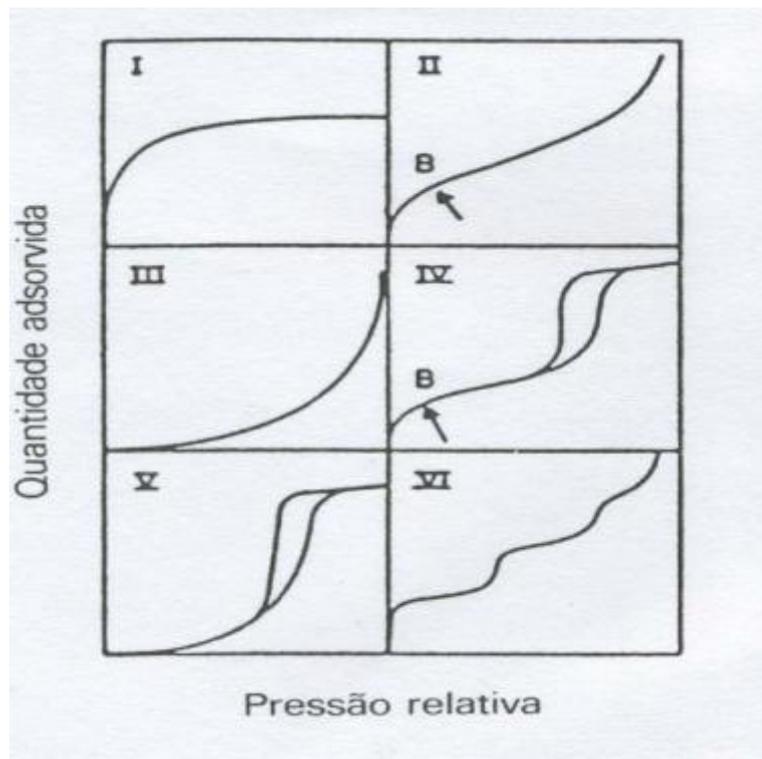


Figura 23. Tipos de isothermas de adsorção.⁷⁵

O formato da isoterma é função do tipo da porosidade do sólido, caracterizada de acordo com o diâmetro do poro.⁷⁴ As Figuras 24a, 24b e 24c ilustram as isothermas de adsorção e dessorção de nitrogênio obtidas para os materiais estudados.

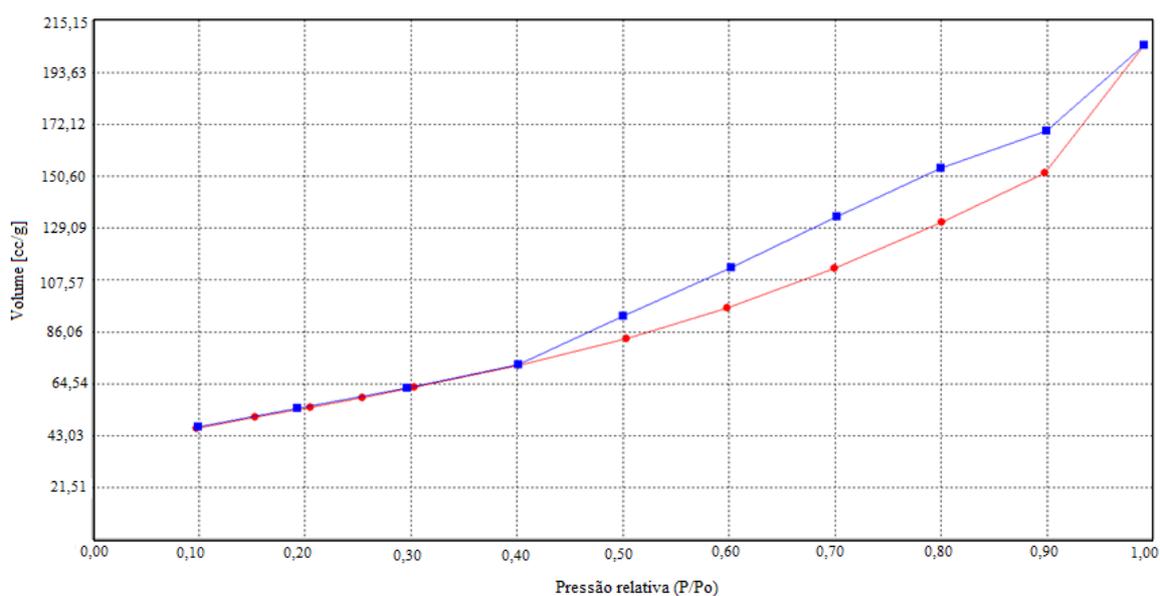


Figura 24a. Isotherma de adsorção (●) e dessorção (●) de nitrogênio para MMT.

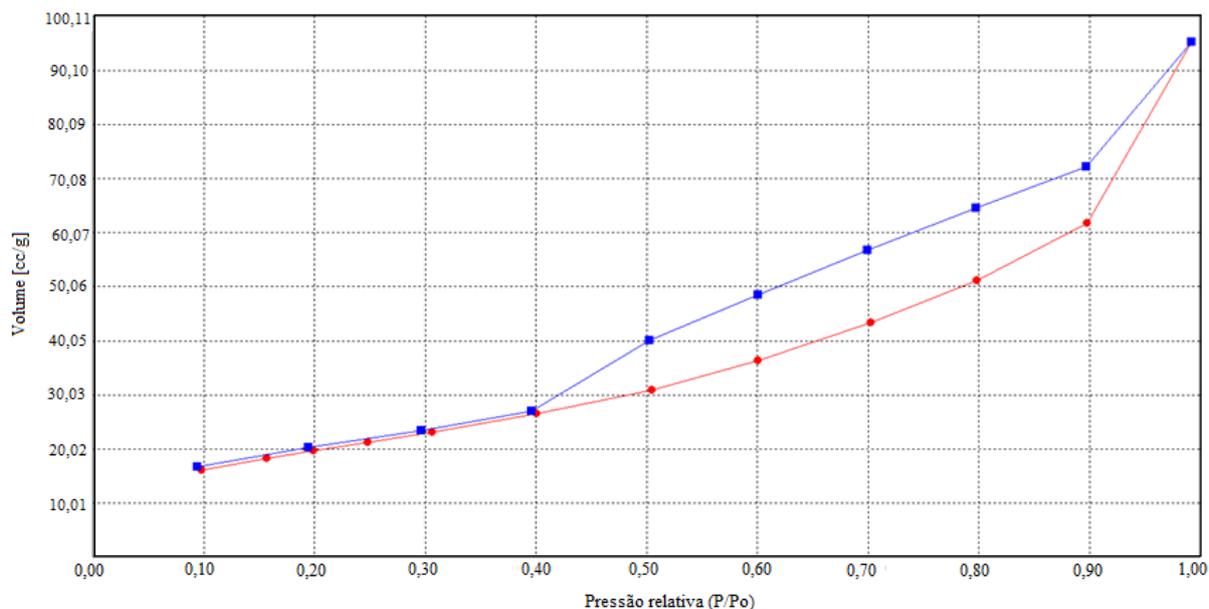


Figura 24b. Isotherma de adsorção (●) e dessorção (●) de nitrogênio para MMT-APTES-Glu.

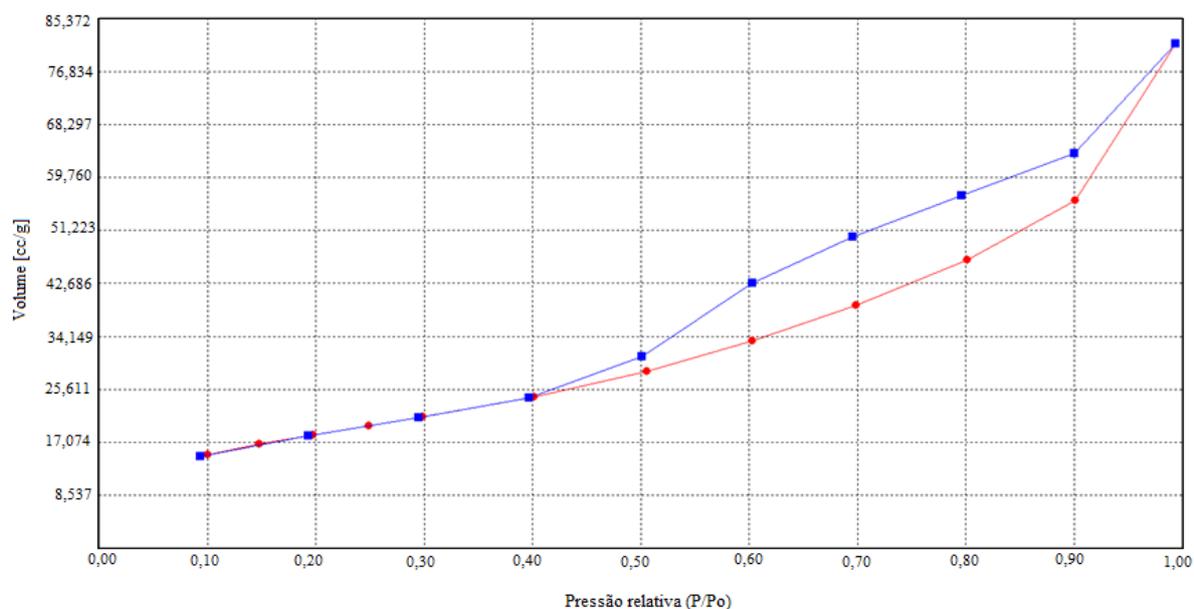
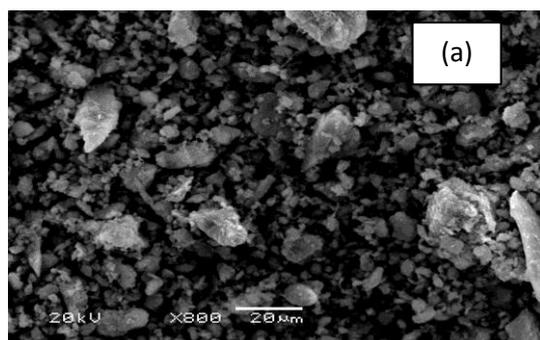


Figura 24c. Isotherma de adsorção (●) e dessorção (●) de nitrogênio para MMT-APTES-Glu-Enz20.

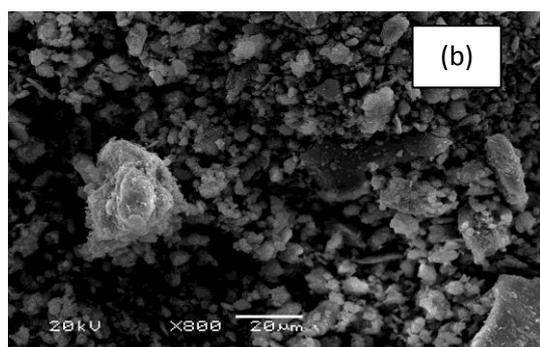
É possível definir que o perfil das isothermas é do tipo IV, característica de sólidos mesoporosos ($20 < \phi < 500 \text{ \AA}$). Esta isoterma exibe uma região onde a pressão relativa varia pouco e o volume adsorvido aumenta bruscamente. Associado ao processo de condensação capilar está o *loop* de histerese, que resulta no total preenchimento dos mesoporos quando a pressão relativa é menor que 1 ($P/P_0 < 1$). A histerese significa que a curva de dessorção não

coincide com a de adsorção.⁷⁶ De acordo com a classificação da IUPAC, o tipo de histerese observado é do tipo H4, característico de materiais lamelares com poros do tipo fenda.^{75; 77}

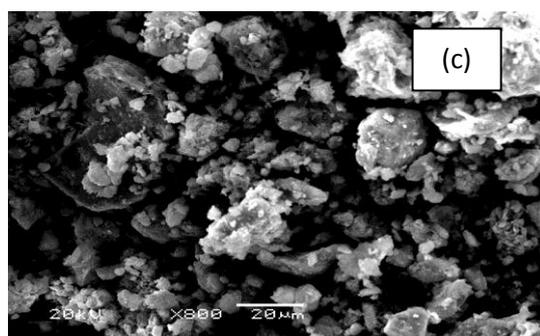
A Figura 25 traz as micrografias obtidas por MEV e a análise da composição qualitativa e semiquantitativa dos elementos presentes na área total observada da argila MMT K10, no material modificado MMT-APTES-Glu e na presença de enzima imobilizada MMT-APTES-Glu-Enz20.



Elemento	Concentração em peso (%)
C	15
O	19
Al	7
Si	36
K	1
Ca	< 1
Fe	3



Elemento	Concentração em peso (%)
C	25
N	19
O	16
Al	4
Si	19
K	< 1
Ca	< 1
Fe	< 2



Elemento	Concentração em peso (%)
C	30
N	10
O	16
Al	4
Si	18
K	< 1
Ca	< 1
Fe	2

Figura 25. Micrografias (800 X) obtidas por MEV e composição definida por EDS: (a) da MMT ativada; (b) da MMT-APTES-Glu; (c) da MMT-APTES-Glu-Enz20.

As imagens geradas através da emissão de elétrons secundários fornecem detalhes da superfície do material. É possível perceber que a modificação da argila com os agentes

APTES e glutaraldeído não provoca uma diferença significativa (Figuras 25a e 25b), uma vez que as duas imagens apresentam partículas com forma e tamanho semelhantes. A quantificação dos elementos presentes na região do material exposta ao feixe de elétrons, obtida por EDS, evidencia a alteração da argila na presença destes compostos, principalmente pelo aumento da concentração dos átomos de carbono e o surgimento do átomo de nitrogênio, presente no composto APTES.

Observa-se que na presença da enzima ocorre a formação de aglomerados de partículas volumosos (Figura 25c). As partículas são mais compactadas, capazes de recobrir a superfície do material, sugerindo que a biomolécula esteja depositada na superfície do suporte e não no espaço interlamelar da argila, provavelmente devido ao tamanho da cadeia da proteína. Estas observações confirmam os resultados da análise de DRX, cujo espaçamento interlamelar da argila não sofreu alterações. Sendo assim, no processo de imobilização a enzima não é inserida entre as lamelas da argila e fica aderida à superfície através da interação das cadeias laterais dos vários grupos de aminoácidos presentes na proteína, conforme observado por Sanjay e Sugunan.⁶⁴

Na tentativa de caracterização da superfície dos biocatalisadores foi realizada a técnica de DRIFTS, que permite a distinção dos grupamentos da superfície da amostra. Neste processo, um feixe incide sobre a amostra e uma parte é absorvida e a outra é refletida difusamente, que então é coletada pelo detector.⁷⁸ A obtenção dos espectros em função Kubelka-Munk possibilita relacionar diretamente a concentração das substâncias com a intensidade das bandas.⁷⁹

A Figura 26 mostra os espectros obtidos para MMT e MMT-APTES-Glu-Enz20. Os espectros apresentam bandas características das argilas esmectitas, conforme observado por Tyagi *et al.*⁸⁰ A banda em 796 cm^{-1} foi relacionada à presença de tridimita, uma das formas cristalinas de sílica. A banda próxima de 1047 cm^{-1} corresponde ao estiramento Si-O no plano. Em 1637 cm^{-1} e 3414 cm^{-1} as bandas são características da flexão e do estiramento do grupo -OH de hidratação, enquanto em 3626 cm^{-1} aparece o estiramento das hidroxilas estruturais presentes nas lamelas das esmectitas dioctaédricas.⁸¹

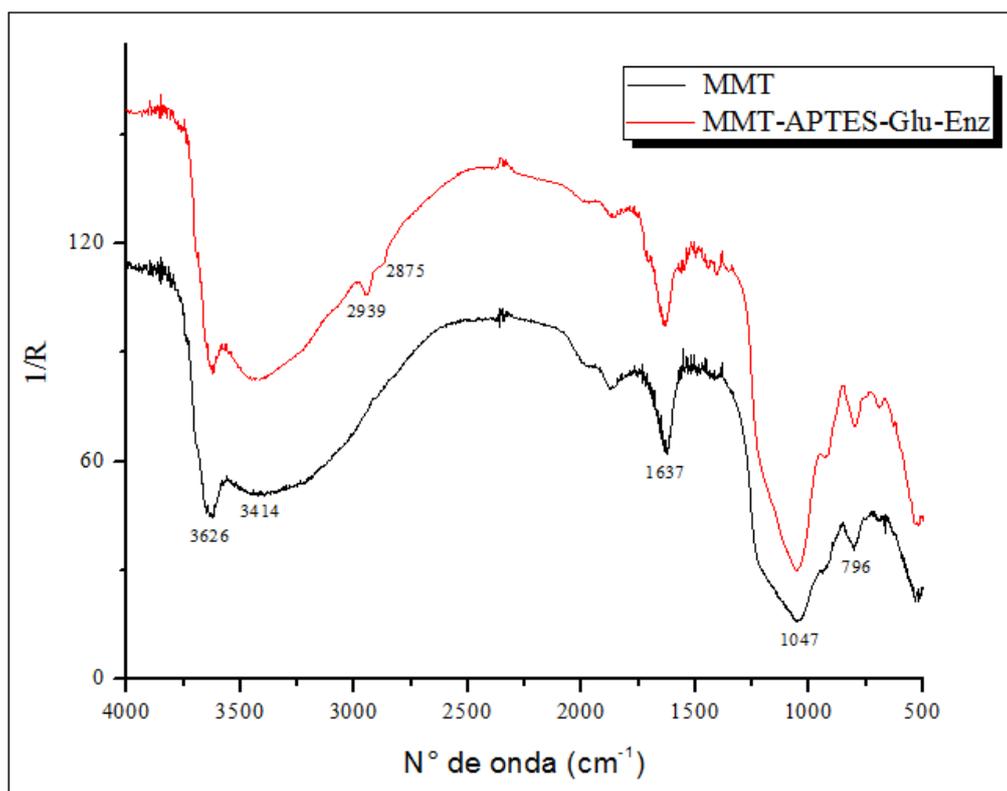


Figura 26. Espectros de DRIFTS obtidos para MMT e MMT-APTES-Glu-Enz20.

A banda de absorção em 2939 cm^{-1} presente no espectro da argila modificada e na presença da enzima corresponde ao estiramento vibracional C-H do grupo CH_2 presente no APTES, no glutaraldeído e também na enzima, confirmando a modificação do suporte com os compostos orgânicos.⁸² Em 2875 cm^{-1} a banda é característica do estiramento vibracional C-H do grupo $-\text{CHO}$ presente na molécula de glutaraldeído.⁵²

A Figura 27 representa as curvas obtidas na análise termogravimétrica, visando estimar a porcentagem de material introduzido à argila baseada na perda de massa em função da temperatura.

Em todos os casos, a primeira perda abaixo de 120 °C é devida às moléculas de água adsorvidas, ligadas fracamente ao suporte. Uma menor perda observada no material modificado sugere um aumento na hidrofobicidade da superfície da MMT após a incorporação do organossilano.^{83; 84}

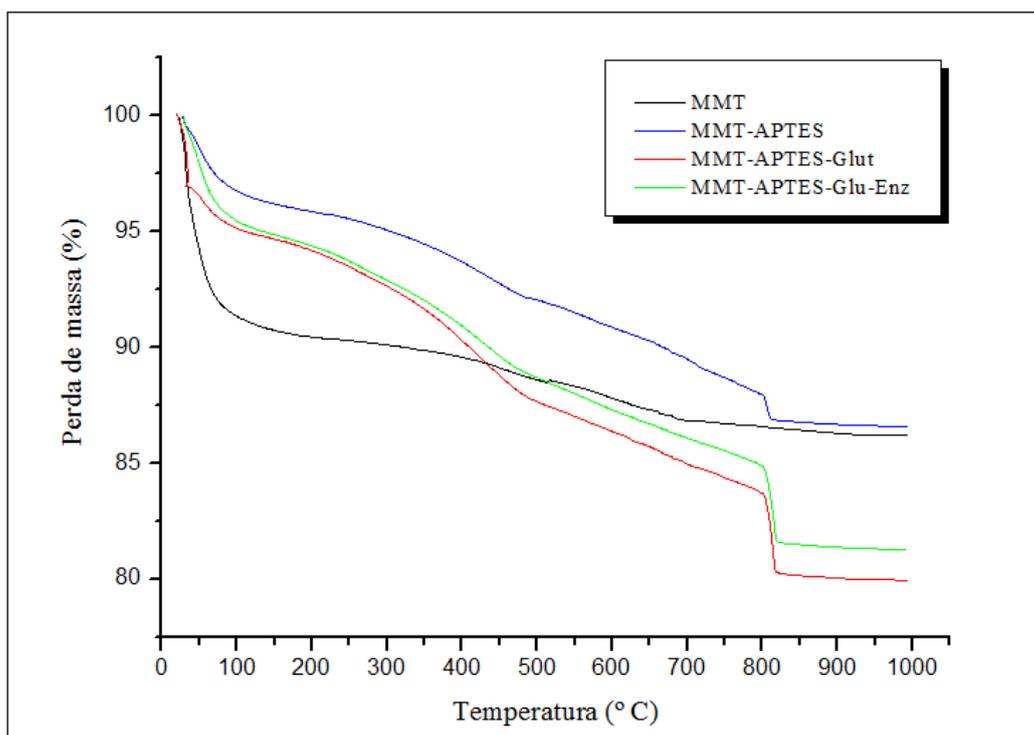


Figura 27. Curvas da análise termogravimétrica para as amostras (a) MMT; (b) MMT-APTES; (c) MMT-APTES-Glu e (d) MMT-APTES-Glu-Enz20.

As curvas das amostras cujos compostos orgânicos foram inseridos mostram comportamentos semelhantes. Próximo a 500 °C, a perda de massa está relacionada à perda das hidroxilas estruturais.⁸⁴ No material silanizado, esta perda chega a quase 5% em massa, devido à saída do APTES. No sistema contendo glutaraldeído, a perda próxima de 9% ocorre pela decomposição dos grupos orgânicos e também devido à condensação dos grupos silanóis, formando siloxanos.⁸⁵ O decaimento acentuado em 800 °C ocorre devido à mudança do gás para oxigênio, garantindo a decomposição de toda a matéria orgânica presente na amostra.

Os dados da Tabela IV resumem as perdas de massa de acordo com o aumento da temperatura e o percentual de material inserido com as modificações do suporte.

Tabela IV. Perdas de massa da argila e suas modificações em função da temperatura.

Amostra	m inicial (mg)	Temperatura (°C)		m perdida (%)		m final (mg)	Material inserido (%)
		120	500	120	500		
MMT	4,2490	120	500	8,9	2,4	3,6630	---
MMT-APTES	4,1000	120	500	3,4	4,5	3,5510	11
MMT-APTES-Glu	4,5840	120	500	3,1	8,9	3,6660	20
MMT-APTES-Glu-Enz20	6,3120	120	500	4,3	6,6	5,1310	17

O percentual de material inserido foi calculado de acordo com a perda de massa entre 120 e 500 °C. Analisando os resultados, é possível concluir que a argila foi modificada na presença dos compostos orgânicos pelo aumento no percentual de material inserido.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

Alguns parâmetros importantes para a caracterização de óleos vegetais foram determinados. A Tabela V mostra a caracterização oleoquímica do azeite de oliva e do óleo de soja de acordo com os métodos especificados.

Tabela V. Caracterização do azeite de oliva e do óleo de soja.

Parâmetro	Limites aceitáveis ⁸⁶	Azeite de oliva	Óleo de soja refinado	Método
Índice de iodo (g de I ₂ /100g óleo)	75 – 94 ^a 120 -143 ^b	82	130	ABNT NBR 9231:2002
Índice de acidez (mg KOH g ⁻¹)	Máx. 1 ^a Máx. 0,3 ^b	0,8	0,4	ABNT NBR 11115:1998
Índice de saponificação (mg KOH g ⁻¹)	184 – 196 ^a 189 – 195 ^b	188	191	AOCS Cd 3-25
Massa molar média (g mol ⁻¹)	---	763,2	811,2	RMN de ¹ H
Número de ligações duplas/mol de óleo	---	2,5	3,9	RMN de ¹ H

^a limites aceitáveis para o azeite de oliva

^b limites aceitáveis para o óleo de soja refinado

De acordo com os dados da tabela, todos os parâmetros determinados para o azeite de oliva e para o óleo de soja estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação, exceto o índice de acidez do óleo de soja, que está ligeiramente acima do especificado.

5.3. REAÇÕES DE HIDRÓLISE

Em virtude da presença de sítios ácidos presentes na argila, a capacidade catalítica da MMT e da MMT-APTES-Glu foi avaliada através do método de hidrólise do azeite de oliva, conforme procedimento descrito por Soares *et al.*³⁹ Os resultados mostraram que a argila e seu derivado modificado não foram capazes de catalisar a reação na ausência da enzima e,

portanto, as reações a seguir não foram realizadas na presença do suporte sem a enzima imobilizada.

As reações de hidrólise foram testadas utilizando os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20, para avaliar o comportamento do método empregado na imobilização da enzima. Os dados foram comparados com os resultados originados através da reação empregando a enzima na forma livre como catalisador, com atividade catalítica de 0,65 U.

Os resultados obtidos na hidrólise do azeite de oliva são apresentados na Tabela VI e são ilustrados na Figura 28.

Tabela VI. Hidrólise do azeite de oliva utilizando a enzima na forma livre e nas formas imobilizadas.

Catalisador^a	Substrato	Óleo:H₂O (m/m)	Tempo (h)	Hidrólise (%)
Lipolase[®] livre	Azeite de oliva	2:1	24	55
Lipolase[®] livre	Azeite de oliva	2:1	48	68
MMT-Enz20	Azeite de oliva	2:1	24	4
MMT-Enz20	Azeite de oliva	2:1	48	5
MMT-APTES-Glu-Enz20	Azeite de oliva	2:1	24	8
MMT-APTES-Glu-Enz20	Azeite de oliva	2:1	48	18
Lipolase[®] livre	Azeite de oliva	3:1	24	19
MMT-Enz20	Azeite de oliva	3:1	24	2
MMT-APTES-Glu-Enz20	Azeite de oliva	3:1	24	4

^a Nas reações com azeite de oliva, a atividade catalítica para MMT-Enz20 foi de 0,08 U e para MMT-APTES-Glu-Enz20 de 0,13 U.

De acordo com os dados da tabela, observa-se um pequeno aumento no rendimento em hidrólise para os sistemas reacionais envolvendo a enzima na forma livre e MMT-APTES-Glu-Enz20 como catalisador com o aumento do tempo da reação de 24 para 48 horas (Figura 28).

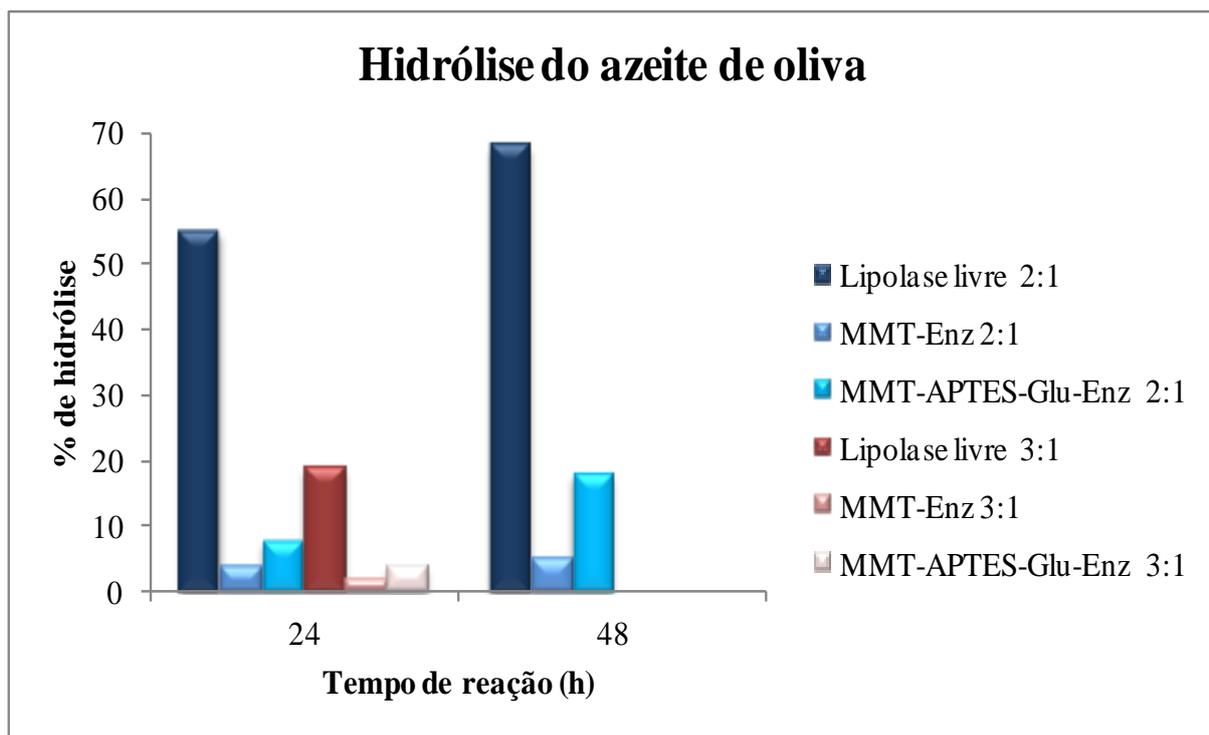


Figura 28. Hidrólise do azeite de oliva utilizando os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 e a enzima livre.

Fica evidente a dependência do rendimento do processo com a concentração de água presente no meio reacional, uma vez que a diminuição desta quantidade provocou uma queda de 65% no rendimento em hidrólise utilizando a enzima na forma livre e praticamente 50% com a utilização dos sistemas imobilizados.

Considerando os resultados obtidos com a utilização da enzima livre como o máximo de rendimento em hidrólise (100%), os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 atingiram cerca de 7% e 14% do rendimento, respectivamente, em 24 horas de reação, na presença de óleo:água igual a 2:1.

Os dados da Tabela VII mostram os resultados obtidos na hidrólise do óleo de soja, também ilustrados graficamente na Figura 29.

É possível perceber que o comportamento da enzima na forma livre foi muito semelhante para os dois substratos utilizados, com um aumento de cerca de 15% na porcentagem de hidrólise quando o tempo de reação aumentou de 24 para 48 horas.

Tabela VII. Hidrólise do óleo de soja utilizando a enzima na forma livre e nas formas imobilizadas.

Catalisador^a	Substrato	Óleo:H₂O (m/m)	Tempo (h)	Hidrólise (%)
Lipolase[®] livre	Óleo de soja	2:1	24	56
Lipolase[®] livre	Óleo de soja	2:1	48	70
MMT-Enz20	Óleo de soja	2:1	24	2
MMT-Enz20	Óleo de soja	2:1	48	< 1
MMT-APTES-Glu-Enz20	Óleo de soja	2:1	24	5
MMT-APTES-Glu-Enz20	Óleo de soja	2:1	48	7
Lipolase[®] livre	Óleo de soja	3:1	24	17
MMT-Enz	Óleo de soja	3:1	24	1
MMT-APTES-Glu-Enz20	Óleo de soja	3:1	24	9

^a Nas reações com óleo de soja, a atividade catalítica para MMT-Enz20 foi de 0,11 U e para MMT-APTES-Glu-Enz20 de 0,15 U.

Resultados semelhantes aos obtidos com a utilização da enzima livre são observados na literatura. Freitas *et al* (2007)⁵ estudaram o comportamento das lipases de *Candida rugosa* e de *Thermomyces lanuginosus* na hidrólise do óleo de soja. Os rendimentos atingiram 70 e 53% em 24 horas de reação, respectivamente. No trabalho de Pandit *et al* (2009), o rendimento na hidrólise do óleo de mamona na presença da lipase de *Aspergillus oryzae* chegou a 60% em 24 horas de reação.

O aumento do tempo da reação de 24 para 48 horas não provocou alteração significativa no rendimento do processo. Da mesma forma como observado para o azeite de oliva, a diminuição da concentração de água presente no sistema provocou uma queda próxima a 70% no rendimento da reação quando empregada a enzima livre, provavelmente por não representar a quantidade mínima necessária para manter a enzima na sua conformação estável. Contudo, para o sistema MMT-APTES-Glu-Enz20 esta alteração foi relevante, proporcionando um aumento de 5% para 9% no rendimento. Comparando os dados obtidos e relacionando o rendimento encontrado com a enzima livre como o máximo possível (100%), o percentual de hidrólise das reações empregando os sistemas MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 atingiram 4% e 9%, respectivamente, na proporção óleo:água igual a 2:1, em 24 horas de reação.

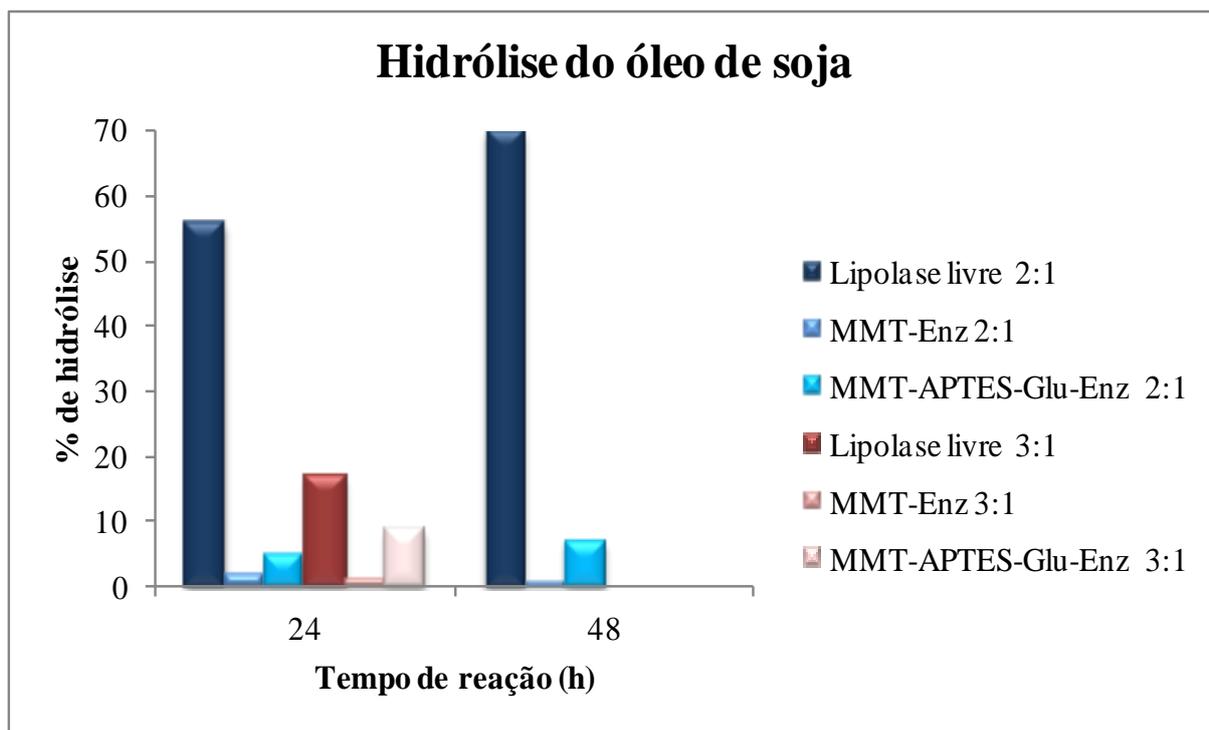


Figura 29. Hidrólise do óleo de soja utilizando a enzima livre e os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20.

Para os dois substratos estudados, os maiores rendimentos foram obtidos com o emprego do biocatalisador MMT-APTES-Glu-Enz20 e em 48 horas de reação, possivelmente devido a maior estabilidade deste sistema, cujas interações que envolvem a ligação suporte-enzima são do tipo covalentes.

Segundo dados da literatura, a reação de hidrólise enzimática depende diretamente da interface óleo-água e do produto formado. Puthli *et al* (2006)⁸⁷ estudaram a hidrólise do óleo de mamona catalisada por lipase de *Aspergillus oryzae* e avaliaram as condições reacionais como tempo, quantidade de enzima, área interfacial e quantidade de produto. De acordo com os autores, o aumento da concentração do produto, o ácido graxo, pode provocar a diminuição na conversão de hidrólise devido à competição do produto com a enzima na ocupação da área interfacial. O trabalho de Talukder *et al* (2010)⁸⁸ mostrou a conversão de óleo de cozinha em biodiesel através da hidrólise utilizando lipase de *Candida rugosa*, seguida por esterificação química. Nas condições estudadas, a atividade máxima da lipase foi atingida quando a razão água:óleo foi 0,5:1 (v/v), quando a área interfacial atingiu o nível máximo. O rendimento em ácidos graxos chegou a 93%, após 10 horas de reação, mantendo a concentração de enzima constante (0,05% em relação à massa de óleo).

5.4. REAÇÕES DE ALCOÓLISE ENZIMÁTICA

As reações de alcoólise foram realizadas utilizando óleo de soja como substrato. O comportamento da enzima livre e dos biocatalisadores imobilizados é apresentado na Tabela VIII e na Figura 30.

De acordo com a relação estequiométrica, a razão molar óleo:metanol mínima para que a reação de alcoólise de triglicerídeos ocorra é igual a 1:3. Neste sentido, os primeiros experimentos foram processados nestas condições. Em 24 horas de reação, o emprego da enzima livre como catalisador da reação promoveu a formação de 18% de ésteres metílicos. O emprego dos sistemas imobilizados mostraram rendimentos inferiores a 10%, sugerindo a modificação do sistema com a finalidade de melhorar o rendimento em ésteres.

Tabela VIII. Alcoólise enzimática do óleo de soja utilizando os biocatalisadores e a enzima livre na presença de metanol como doador acila.

Catalisador ^a	Razão óleo:MeOH	Tempo (h)	Rendimento (%)
Lipolase [®] livre	1:3	24	18
MMT-Enz20	1:3	24	3
MMT-APTES-Glu-Enz20	1:3	24	7
MMT-Enz20	1:4	24	0
MMT-APTES-Glu-Enz20	1:4	24	0
Lipolase [®] livre	1:6	24	59
MMT-Enz20	1:6	24	0
MMT-APTES-Glu-Enz20	1:6	24	3
MMT-Enz20	1:6	48	0
MMT-APTES-Glu-Enz20	1:6	48	5

^a A atividade catalítica para os sistemas MMT-Enz e MMT-APTES-Glu-Enz foi de 0,07U.

Alguns estudos têm apresentado a influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleos vegetais através de um planejamento fatorial. Foi possível perceber que a temperatura, a concentração de enzima, a concentração de água e a razão óleo:álcool afetam diretamente o rendimento do processo.⁸⁹ A quantidade de água é um parâmetro importante, pois ajuda a manter a estrutura catalítica da enzima na forma ativa. Ainda assim, devido ao

caráter reversível da reação de alcoólise, uma quantidade de álcool em excesso é requerida para melhorar o rendimento da reação. O metanol é o álcool mais utilizado devido ao baixo custo e por reagir rapidamente com o triglicerídeo. Em contrapartida, as enzimas são inativadas na presença de álcoois de cadeia curta. Como forma de evitar este problema, alguns trabalhos como o de Hernández *et al* (2008)⁹⁰ têm avaliado a adição do metanol em etapas, evitando a inativação da enzima e aumentando o rendimento da reação de alcoólise para aproximadamente 90% em 7 horas de reação. Quanto à presença de solvente, este torna o meio reacional homogêneo, solubiliza a glicerina originada como produto e melhora a solubilidade do álcool no óleo, otimizando a interação entre os substratos. Apesar destas vantagens, pode apresentar algumas desvantagens através da interação direta com a enzima, rompendo as interações hidrofóbicas com substratos, produtos e com a água do microambiente da enzima.

Diante destes fatores, as reações foram conduzidas na presença de excesso de metanol.

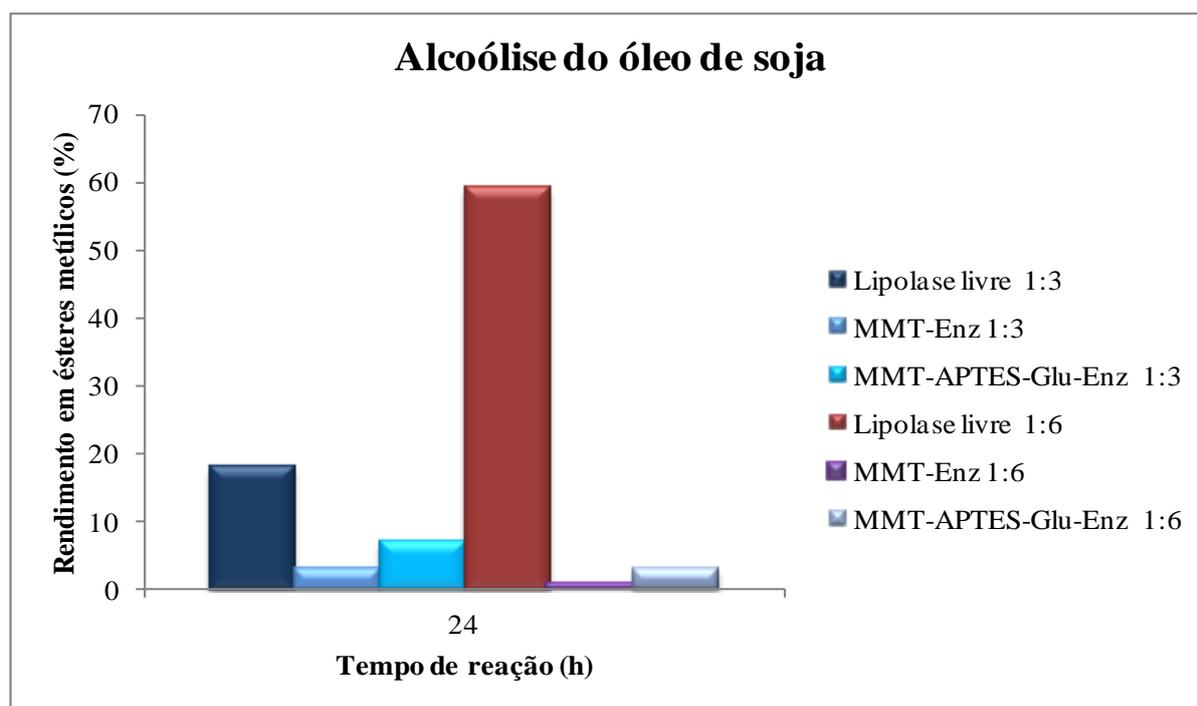


Figura 30. Rendimento em éster metílico do óleo de soja utilizando a enzima livre e os sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20.

Mantendo as demais variáveis do processo inalteradas, com a razão molar óleo:metanol igual a 1:4 não foi possível observar a formação de ésteres metílicos em 24 horas de reação. Já com a adição de metanol em 3 etapas, a enzima livre mostrou um

rendimento três vezes maior do que o obtido com a utilização de 3 mols de metanol em uma única etapa. Contudo, com o emprego do sistema imobilizado MMT-Enz20 não ocorreu a formação de ésteres, enquanto com o biocatalisador MMT-APTES-Glu-Enz20 os rendimentos foram semelhantes aos obtidos com a reação na presença de 1 mol de óleo e 3 mols de metanol.

Um dos fatores que podem influenciar a diminuição da atividade da enzima no processo de alcoólise e conseqüentemente provocar a redução do rendimento em ésteres é a concentração de glicerol formado durante o processo. A presença de altas concentrações deste produto pode provocar a inibição da atividade catalítica da enzima através do recobrimento do sítio ativo, impedindo a interação com o substrato. Uma das alternativas é a remoção do glicerol obtido, promovendo o deslocamento do equilíbrio para a formação dos ésteres, aumentando o rendimento da reação.^{14; 69; 73}

5.5. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OPERACIONAL

A capacidade de reutilizar um catalisador é um fator importante quando se avalia a aplicação prática. Desta forma, os testes de reusabilidade são realizados para determinar a eficácia e a estabilidade da enzima após sucessivas reutilizações.

A estabilidade operacional dos sistemas imobilizados nos testes de hidrólise empregando *p*-NPP foi avaliada em 10 ciclos consecutivos, cujos resultados são mostrados na Tabela IX e na Figura 31. Os dados estão representados em termos de atividade catalítica (U), cujo valor determinado no primeiro ciclo de reação foi designado como 100%.

Tabela IX. Reações de hidrólise do *p*-NPP utilizando os sistemas imobilizados em 10 ciclos consecutivos.

Ciclos	Catalisador MMT-Enz20	U (µmol/min)	Catalisador MMT-APTES- Glu-Enz20	U (µmol/min)
1		0,08		0,06
2		0,10		0,06
3		0,11		0,07
4		0,09		0,07
5		0,09		0,09
6		0,11		0,08
7		0,11		0,06
8		0,07		0,06
9		0,05		0,05
10		0,08		0,07

Avaliando os resultados obtidos, pode-se perceber que os sistemas imobilizados mantêm a atividade catalítica no decorrer dos ciclos, sem perdas significativas. O biocatalisador obtido através do método de ligação covalente mostrou um comportamento com menor flutuação, possivelmente pelo caráter da ligação entre o suporte e a enzima.

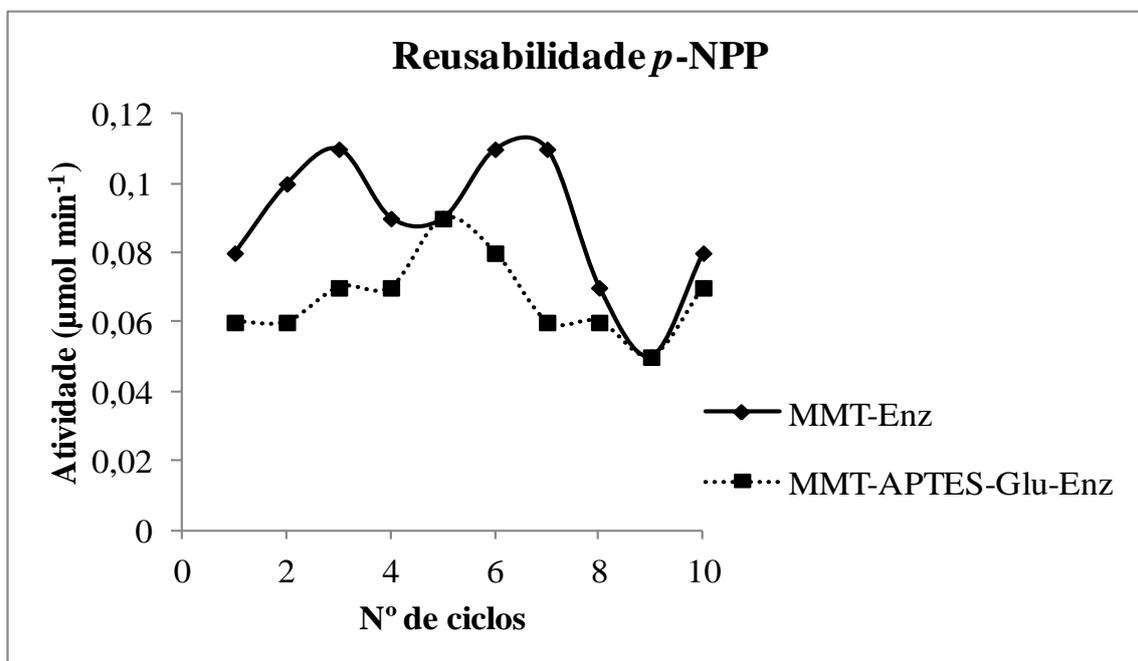


Figura 31. Reusabilidade dos sistemas imobilizados MMT-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20 nas formas (♦) adsorvida e (■) ligação covalente, realizada através da hidrólise do *p*-NPP.

A reutilização dos biocatalisadores também foi observada nas reações de hidrólise do azeite de oliva e do óleo de soja. A Tabela X mostra os resultados obtidos em 5 ciclos de reação.

Tabela X. Acompanhamento da reutilização dos biocatalisadores nas reações de hidrólise utilizando azeite de oliva e óleo de soja como substratos.

Ciclos	% de hidrólise			
	MMT-Enz20		MMT-APTES-Glu-Enz20	
	Oliva	Soja	Oliva	Soja
1	1,21	5,20	2,57	4,87
2	2,00	2,57	3,21	5,20
3	1,18	0,98	1,44	5,14
4	1,07	0,39	0,83	2,26
5	0,05	0,32	0,50	1,30

Observando a Figura 32 e analisando os dados da tabela, o sistema MMT-Enz20 apresenta uma perda gradual no rendimento da hidrólise do óleo de soja, perdendo praticamente toda a atividade catalítica ao final do 5º ciclo. Entretanto, o biocatalisador MMT-APTES-Glu-Enz20 mantém a estabilidade até o 3º ciclo, mostrando uma queda no rendimento apenas a partir do 4º ciclo de reação.

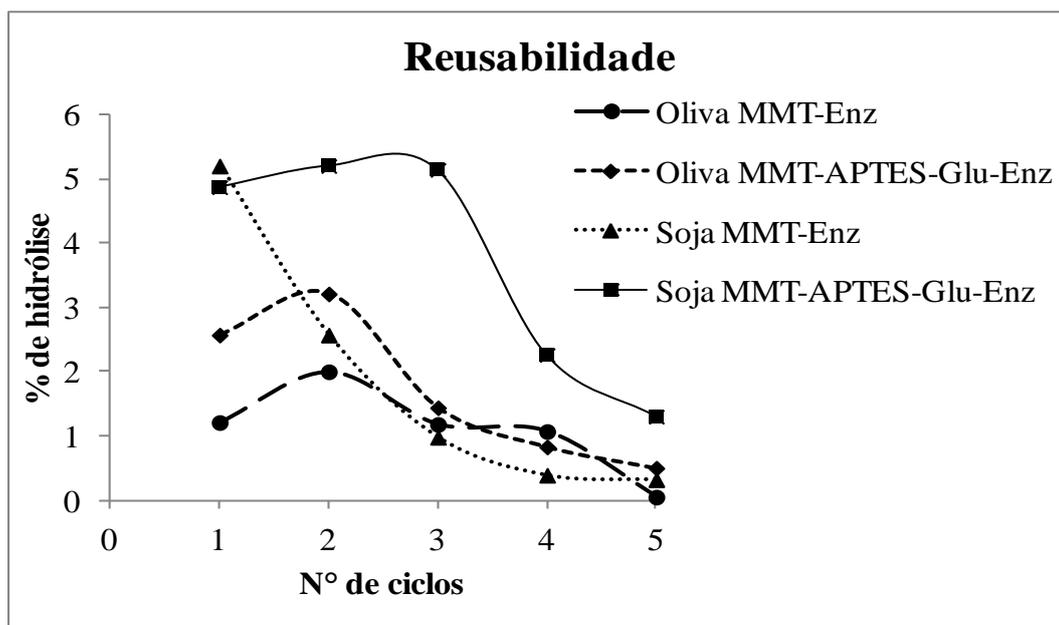


Figura 32. Reusabilidade dos sistemas imobilizados MMT-Enz e MMT-APTES-Glu-Enz na reação de hidrólise do azeite de oliva e do óleo de soja durante 5 ciclos consecutivos.

O comportamento do sistema MMT-Enz20 na reação utilizando o azeite de oliva como substrato mostrou uma estabilidade significativa até o 4º ciclo de reutilização, enquanto o biocatalisador MMT-APTES-Glu-Enz20 apresentou uma perda gradativa após o 2º ciclo de reação.

A redução acentuada no percentual de hidrólise observada em alguns casos pode ser atribuída à perda de biocatalisador durante o processo de separação.⁶⁹

5.6. ESTABILIDADE NO ARMAZENAMENTO DOS SISTEMAS IMOBILIZADOS

Normalmente, quando não submetidas a variações extremas de pH e temperatura, as enzimas imobilizadas mantêm a atividade catalítica e geralmente apresentam uma maior estabilidade quando comparadas com a enzima na sua forma livre. A enzima imobilizada foi armazenada em tampão fosfato pH 8,0 e a atividade residual medida através do método de hidrólise do *p*-NPP, conforme item 4.6.

A Figura 33 resume os resultados obtidos, na qual é possível observar algumas variações na atividade catalítica dos sistemas.

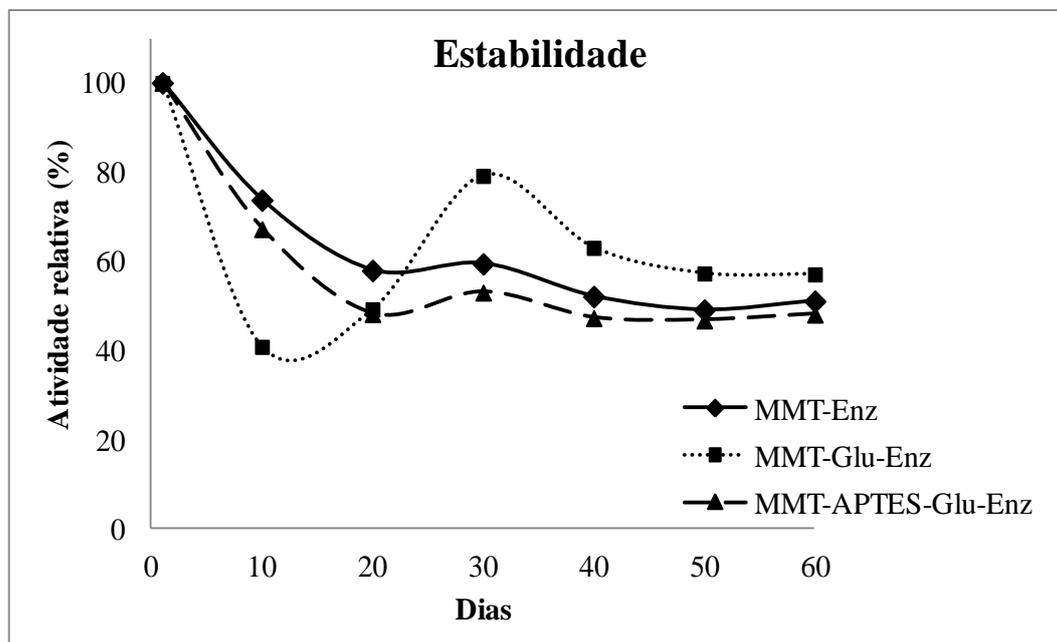


Figura 33. Estudo de estabilidade no armazenamento dos sistemas imobilizados MMT-Enz20, MMT-Glu-Enz20 e MMT-APTES-Glu-Enz20. Os biocatalisadores foram armazenados em tampão fosfato pH 8,0 e acondicionados a 4 °C.

Apesar da oscilação observada durante o período de estudo, os sistemas imobilizados mantiveram cerca de 50% da atividade inicial após 60 dias de armazenamento.

6. CONCLUSÕES

A utilização da argila montmorilonita K10 como suporte para imobilização da enzima Lipolase[®] mostrou resultados satisfatórios, com rendimentos de imobilização próximos a 90% quando a menor quantidade de solução enzimática foi disponibilizada para a imobilização. O sistema suporte-enzima obtido através da modificação da argila com APTES e glutaraldeído apresentou melhor estabilidade frente ao material derivado do processo de adsorção, conforme era esperado. A eficiência dos sistemas biocatalíticos chegou a 40%, indicando que grande parte da atividade catalítica da enzima foi perdida durante o processo de imobilização, provavelmente pelo envolvimento dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela ação catalítica da enzima na ligação com o suporte, provocando alterações conformacionais na enzima.

A caracterização dos sistemas catalíticos por um conjunto de técnicas permitiu observar que a molécula de enzima foi imobilizada na superfície da argila e não no espaço entre as lamelas. Isto se dá provavelmente pelo elevado tamanho da estrutura da enzima, que acaba interagindo com o suporte através dos resíduos de aminoácidos das cadeias laterais.

O emprego dos sistemas suporte-enzima nas reações de hidrólise do azeite de oliva e do óleo de soja mostrou baixa atividade catalítica. Os melhores rendimentos foram encontrados para o sistema catalítico MMT-APTES-Glu-Enz20, chegando a 7% nas reações envolvendo o azeite de oliva e 9% para os processos utilizando óleo de soja como substrato.

Nas reações de alcoólise enzimática do óleo de soja, o sistema MMT-APTES-Glu-Enz20 apresentou melhor atividade catalítica, produzindo 7% de rendimento em ésteres metílicos em 24 horas de reação, na presença da razão óleo:metanol igual a 1:3. O excesso de metanol e sua adição em três etapas foi eficiente apenas para a reação na presença da enzima na forma livre, não favorecendo os sistemas empregando a enzima imobilizada. Utilizando o sistema catalítico MMT-Enz20 não foi possível observar a formação de ésteres em 24 horas de reação nestas condições.

Os estudos de estabilidade operacional mostraram que é possível a reutilização dos sistemas catalíticos pelo menos por 3 ciclos consecutivos sem perda significativa da atividade catalítica, exceto nas reações com óleo de soja utilizando MMT-Enz20 como catalisador, valorizando uma das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas que é a capacidade de reutilização. Quanto à estabilidade, os biocatalisadores obtidos mantiveram cerca de 50% da atividade inicial após 60 dias de armazenamento, quando acondicionadas em tampão fosfato pH 8,0 e sob refrigeração.

O desenvolvimento deste trabalho contribuiu para o estudo de novas alternativas para a imobilização de enzimas, visando à utilização de materiais de grande disponibilidade, baixo custo e mecanicamente estáveis como no caso das argilas, além de possibilitar a aplicação em processos de modificação de óleos vegetais com menor agressividade ao meio ambiente.

7. PERSPECTIVAS

Os métodos de imobilização apresentados neste trabalho necessitam ser otimizados, buscando atingir o melhor desempenho da enzima. Uma das alternativas é a modificação da argila com outros materiais que possibilitem a interação com a enzima, como compostos contendo grupos epóxi, ou investigar a imobilização em outros tipos de suportes, tais como polímeros e fibras naturais.

Para as reações de hidrólise dos óleos vegetais, analisar a proporção de água presente no sistema reacional, a fim de manter uma conformação estável e cataliticamente ativa da enzima e gerar uma interface água:óleo ideal para o processo de hidrólise enzimática. Nos sistemas das reações de alcoólise, determinar a concentração ideal de metanol e estudar a forma de adição ao sistema reacional, a fim de garantir o máximo rendimento em ésteres, sem afetar a atividade catalítica da enzima.

8. BIBLIOGRAFIA

- ¹ CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. D. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova* **2004**, v. 27, n. 1, p. 146-156.
- ² SUAREZ, P. A. Z. et al. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise oleoquímica. *Quim. Nova* **2007**, v. 30, n. 3, p. 667-676.
- ³ TEIXEIRA, S. Modificações catalíticas de óleos vegetais para produção de insumos químicos. *Tese de Doutorado*, Campinas, 2006.
- ⁴ ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochem.* **2001**, v. 36, n. 10, p. 947-953.
- ⁵ FREITAS, L. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, v. 23, n. 12, p. 1725-1731.
- ⁶ CASTRO, H. F.; VIEIRA, F. C. V.; PIERRE, C. T. Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática. *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. São Paulo, SP, 2005.
- ⁷ CARVALHO, P. D. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Quim. Nova* **2003**, v. 26, n. 1, p. 75-80.
- ⁸ RITTNER, H. Óleo de palma: Processamento e utilização. 1ª edição. São Paulo, 1996.
- ⁹ MACEIRAS, R. et al. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. *Fuel* **2009**, v. 88, n. 11, p. 2130-2134.
- ¹⁰ LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energy* **2010**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095.
- ¹¹ RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem.* **2010**, v. 45, n. 8, p. 1268-1273.

- ¹² GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renewable Energy* **2012**, v. 39, n. 1, p. 10-16.
- ¹³ PESSOA, F. L. P.; MAGALHES, S. P.; FALCAO, P. W. D. Production of Biodiesel via Enzymatic Ethanolysis of the Sunflower and Soybean Oils: Modeling. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, v. 161, n. 1-8, p. 238-244.
- ¹⁴ SHAHLA, S.; CHENG, N. G.; YUSOFF, R. An Overview on Transesterification of Natural Oils and Fats. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2010**, v. 15, n. 6, p. 891-904.
- ¹⁵ XU, Y. Q. et al. Improving adsorption and activation of the lipase immobilized in amino-functionalized ordered mesoporous SBA-15. *Solid State Sci.* **2011**, v. 13, n. 5, p. 867-874.
- ¹⁶ YE, P.; JIANG, J.; XU, Z. K. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. *Colloids Surf., B* **2007**, v. 60, n. 1, p. 62-67.
- ¹⁷ MACARIO, A. et al. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2009**, v. 118, n. 1-3, p. 334-340.
- ¹⁸ HASAN, S. D. M.; MELO, D. N. C.; FILHO, R. M. Simulation and response surface analysis for the optimization of a three-phase catalytic slurry reactor. *Chem. Eng. Process.* **2005**, v. 44, n. 3, p. 335-343.
- ¹⁹ MILETIC, N. et al. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins-Versatile immobilization supports for biocatalysts. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **2009**, v. 56, n. 4, p. 196-201.
- ²⁰ COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia Enzimática. Petrópolis, RJ: 2008.
- ²¹ HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, v. 39, n. 2, p. 235-251.
- ²² DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim. Nova* **2004**, v. 27, n. 4, p. 623-630.
- ²³ JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial Lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **1998**, v. 16, p. 396-403.

- ²⁴ RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. *Tese de Doutorado*, Porto Alegre, 2009.
- ²⁵ JAEGER, K.-E. et al. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, v. 15, n. 1, p. 29-63.
- ²⁶ FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **2010**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212.
- ²⁷ RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. *Process Biochem.* **2009**, v. 44, n. 9, p. 963-968.
- ²⁸ PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Quim. Nova* **2006**, v. 29, n. 1, p. 93-99.
- ²⁹ LEI, L. et al. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, v. 321, n. 4, p. 252-258.
- ³⁰ ZHOU, G. W.; CHEN, Y. J.; YANG, S. H. Comparative studies on catalytic properties of immobilized *Candida rugosa* lipase in ordered mesoporous rod-like silica and vesicle-like silica. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2009**, v. 119, n. 1-3, p. 223-229.
- ³¹ MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463.
- ³² SECUNDO, F. et al. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2008**, v. 109, n. 1-3, p. 350-361.
- ³³ SEBRÃO, D. et al. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. *Quim. Nova* **2007**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187.
- ³⁴ ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* **1998**, v. 39, n. 2, p. 23-39.
- ³⁵ HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, v. 38, n. 2, p. 453-468.
- ³⁶ SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307.

- ³⁷ VAIDYA, B. K. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-thylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresour. Technol.* **2008**, v. 99, n. 9, p. 3623-3629.
- ³⁸ CHAUBEY, A. et al. *Arthrobacter* sp lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. *Process Biochem.* **2009**, v. 44, n. 2, p. 154-160.
- ³⁹ SOARES, C. M. F. et al. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **2006**, v. 39, n. 1-4, p. 69-76.
- ⁴⁰ DE FUENTES, I. E. et al. Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **2001**, v. 11, n. 4-6, p. 657-663.
- ⁴¹ MALCATA, F. X. et al. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, v. 67, n. 12, p. 890-910.
- ⁴² RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, v. 51, n. 3-4, p. 100-109.
- ⁴³ ADRIANO, W. S. Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana. *Tese de Doutorado*, São Carlos, 2008.
- ⁴⁴ RAMANI, K. et al. Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil. *Process Biochem.* **2010**, v. 45, n. 6, p. 986-992.
- ⁴⁵ GOPINATH, S.; SUGUNAN, S. Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Appl. Clay Sci.* **2007**, v. 35, n. 1-2, p. 67-75.
- ⁴⁶ HART, M. P.; BROWN, D. R. Surface acidities and catalytic activities of acid-activated clays. *J. Mol. Catal. A:Chem.* **2004**, v. 212, n. 1-2, p. 315-321.
- ⁴⁷ NETO, É. T.; NETO, Â. A. T. Modificação Química de Argilas: Desafios científicos e tecnológicos para obtenção de novos produtos com maior valor agregado. *Quim. Nova* **2009**, v. 32, n. 3, p. 809-817.
- ⁴⁸ KHEDHER, I. et al. Vanadium sites in V-K10: Characterization and catalytic properties in liquid-phase sulfide oxidation. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, v. 255, n. 1-2, p. 92-96.

- ⁴⁹ VACCARI, A. Preparation and catalytic properties of cationic and anionic clays. *Catal. Today* **1998**, v. 41, n. 1-3, p. 53-71.
- ⁵⁰ SEREFOGLOU, E. et al. Smectite clays as solid supports for immobilization of beta-glucosidase: Synthesis, characterization, and biochemical properties. *Chem. Mater.* **2008**, v. 20, n. 12, p. 4106-4115.
- ⁵¹ GUIMARÃES, A. M. F.; CIMINELLI, V. S. T.; VASCONCELOS, W. L. Funcionalização de argila natural com mercapto-organossilano. *17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*. Foz do Iguaçu, PR, 2006.
- ⁵² YIGITOGU, M.; TEMOCIN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, v. 66, n. 1-2, p. 130-135.
- ⁵³ MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, v. 68, n. 1, p. 109-115.
- ⁵⁴ GOPINATH, S.; SUGUNAN, S. Enzymes immobilized on montmorillonite: Comparison of performance in batch and packed-bed reactors. *React. Kinet. Catal. Lett.* **2006**, v. 88, n. 1, p. 3-9.
- ⁵⁵ AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim de Biotecnologia* **2002**, v. 72, p. 2-13.
- ⁵⁶ CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* **2000**, v. 82, p. 1063-1085.
- ⁵⁷ SALIS, A. et al. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26.
- ⁵⁸ GAGNON, M. D.; VASUDEVAN, P. T. Effects of Solvent and Enzyme Source on Transesterification Activity. *Energy & Fuels* **2011**, v. 25, n. 10, p. 4669-4674.
- ⁵⁹ **ABNT**. NBR 9231: *Insumos - Substâncias graxas - Determinação do índice de iodo*. Rio de Janeiro 2002.
- ⁶⁰ **ABNT**. NBR 11115: *Substâncias graxas - Determinação do índice de acidez*. Rio de Janeiro 1998.

⁶¹ AOCS. (Cd 3-25) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. Champaign 2008.

⁶² MIYAKE, Y.; YOKOMIZO, K.; MATSUZAKI, N. Rapid determination of iodine value by H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, v. 75, n. 1, p. 15-19.

⁶³ KNOTHE, G. Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, v. 77, n. 5, p. 489-493.

⁶⁴ SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Acid activated montmorillonite: an efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes. *J. Porous Mater.* **2008**, v. 15, n. 3, p. 359-367.

⁶⁵ WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *serratia-marcescens*. *J. Bacteriol.* **1979**, v. 138, n. 3, p. 663-670.

⁶⁶ ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim. Nova* **1998**, v. 21, n. 6, p. 787-792.

⁶⁷ BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, v. 72, p. 248-254.

⁶⁸ LI, S. F.; WU, W. T. Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* **2009**, v. 45, n. 1, p. 48-53.

⁶⁹ RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. *Biochem. Eng. J.* **2009**, v. 47, n. 1-3, p. 93-99.

⁷⁰ MURRAY, M. et al. Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. *Process Biochem.* **1997**, v. 32, n. 6, p. 479-486.

⁷¹ PADILHA, M. E. D. S.; RUIZ, W. A. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. *Ciência e Tecnol. de Alimentos* **2007**, v. 27, n. 2, p. 285-290.

⁷² SCHNEIDER, R. D. C. D. S. Extração, caracterização e transformação do óleo de rícino. *Tese de Doutorado*, Porto Alegre, 2003.

⁷³ MACEIRAS, R. et al. Enzyme deactivation during biodiesel production. *Chem. Eng. J.* **2011**, v. 166, n. 1, p. 358-361.

⁷⁴ COUTINHO, F. M. B.; TEIXEIRA, V. G.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. *Quim. Nova* **2001**, v. 24, n. 6, p. 808-818.

⁷⁵ FIGUEIREDO, J. L.; RIBEIRO, F. R. Catálise heterogênea. Porto, Lisboa: 1989.

⁷⁶ AMGARTEN, D. R. Determinação do volume específico de poros de sílicas cromatográficas por dessorção de líquidos em excesso. *Dissertação de Mestrado*, Campinas, 2006.

⁷⁷ GIL, R. A. S. S. et al. Extração de ferro de esmectita brasileira com emprego do método ditionito-citrato-carbonato. *Quim. Nova* **2000**, v. 23, n. 3, p. 297-302.

⁷⁸ DALANNAY, F.; DELMON, B. Characterization of heterogeneous catalysts. Nova Iorque, USA: 1984.

⁷⁹ PASTORE, T. C. M. et al. Efeito do intemperismo artificial em quatro madeiras tropicais monitorado por espectroscopia de infravermelho (DRIFT). *Quim. Nova* **2008**, v. 31, n. 8, p. 2071-2075.

⁸⁰ TYAGI, B.; CHUDASAMA, C. D.; JASRA, R. V. Determination of structural modification in acid activated montmorillonite clay by FT-IR spectroscopy. *Spectrochim. Acta, Part A* **2009**, v. 64, n. 2, p. 273-278.

⁸¹ CAGLAR, B. et al. Characterization of the cation-exchanged bentonites by XRPD, ATR, DTA/TG analyses and BET measurement. *Chem. Eng. J.* **2009**, v. 149, n. 1-3, p. 242-248.

⁸² XUE, A. L. et al. Adsorption of reactive dyes from aqueous solution by silylated palygorskite. *Appl. Clay Sci.* **2010**, v. 48, n. 4, p. 638-640.

⁸³ OLIVEIRA, V. V. Novos adsorventes derivados de sílica gel modificada com aminas e glutaraldeído. *Dissertação de Mestrado*, João Pessoa, 2008.

⁸⁴ GUGGENHEIM, S.; VAN GROOS, A. F. K. Baseline studies of The Clay Minerals Society Source Clays: Thermal analysis. *Clays Clay Miner.* **2001**, v. 49, n. 5, p. 433-443.

⁸⁵ RAMOS, M. A. et al. Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives. *Powder Technol.* **1998**, v. 99, n. 1, p. 79-85.

⁸⁶ ANVISA. Resolução 482 - Regulamento técnico para fixação da identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. Brasil 1999.

⁸⁷ PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies. *Biochem. Eng. J.* **2006**, v. 31, n. 1, p. 31-41.

⁸⁸ TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. *Energy & Fuels* **2010**, v. 24, p. 2016-2019.

⁸⁹ OLIVEIRA, D. et al. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática do óleo de mamona. *Ciência e Tecnol. de Alimentos* **2004**, v. 24, p. 178-182.

⁹⁰ HERNANDEZ-MARTIN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM. *Bioresour. Technol.* **2008**, v. 99, n. 2, p. 277-286.