

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**NATÁLIA BOSCARIOL MACHADO**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE SÍLICA DA CASCA  
DE ARROZ FUNCIONALIZADA NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E APLICAÇÃO  
NA SÍNTESE DE ÉSTERES**

Alfenas/MG

2018

**NATÁLIA BOSCARIOL MACHADO**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE SÍLICA DA CASCA  
DE ARROZ FUNCIONALIZADA NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E APLICAÇÃO  
NA SÍNTESE DE ÉSTERES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas no Programa de Pós-Graduação em Química na área de concentração – Química Orgânica como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Co-orientadora: Prof. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz

Alfenas – MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central - Sede

Machado, Natália Boscarol

M149p Preparação e caracterização de partículas de sílica da casca de arroz funcionalizada na imobilização de lipase e aplicação na síntese de ésteres / Natália Boscarol Machado. – Alfenas/MG, 2018.  
74 f.: il --

Orientador: Adriano Aguiar Mendes .  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.  
Bibliografia.

1. Sílica - arroz. 2. Lipase. 3. Adsorção. 4. Lubrificante - Recursos Renováveis. I. Mendes, Adriano Aguiar. II. Título.

CDD-547.01

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva  
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

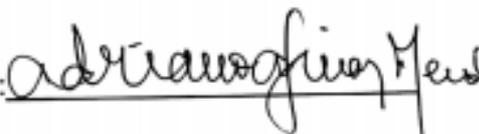
## Natália Boscarol Machado

***"Preparação e caracterização de partículas de sílica de casca de arroz funcionalizada na imobilização de lipase e aplicação na síntese de ésteres"***

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 25/05/2018

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. José Maurício S. Ferreira da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico esta dissertação aos meus pais José e Maria, ao meu irmão Rodrigo, meu filho Pedro e meu marido Felipe que me apoiaram, incentivaram e me ajudaram desde o início desta jornada. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar comigo, por tudo o que Ele me proporcionou para poder ter chegado até aqui.

Aos meus pais, José Carlos e Maria das Dores, meu irmão Rodrigo, meu esposo Felipe e meu filho Pedro Henrique, por me apoiarem e terem paciência nessa jornada de dois anos. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, me motivando e sendo minha base.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, sem qual nada disso seria possível. Obrigada por ter me aceitado como sua aluna de mestrado, por toda paciência em ensinar e me orientar neste projeto. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos, experiências e virtudes. Levarei comigo por toda minha vida tudo o que vivenciamos e aprendi nestes dois anos.

À minha orientadora Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz, por também compartilhar comigo seus conhecimentos e por todas as suas orientações.

À Universidade Federal de Alfenas, pela ótima estrutura e apoio que concede aos seus alunos de pós-graduação, sempre incentivando e auxiliando no desenvolvimento dos projetos e aprendizado. Gostaria de agradecer também ao pessoal do Laboratório de Bioprocessos, Gustavo e Daniela, pelo auxílio e acolhida, vocês foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao meu colega de estudos, João Pedro Miguez, por todas as horas de trabalho juntos no laboratório e por me auxiliar na conclusão de vários ensaios.

Aos professores do Instituto de Química da Unifal-MG, pelos ensinamentos compartilhados e esclarecimentos de dúvidas.

À secretaria de pós-graduação, Marcela Martins, por toda ajuda e esclarecimentos, dedicação e prestez.

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro e à CAPES pela concessão de bolsa.

## RESUMO

Sílica de casca de arroz foi extraída por um processo termoquímico e funcionalizada com trietóxi(octil)silano (OCTES) para a preparação de um suporte hidrofóbico (Octil-SiO<sub>2</sub>) para ser usado na imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) via ativação interfacial. Diferentes técnicas tais como distribuição de tamanho de partícula, difração de Raio-X (DRX), análise termogravimétrica (ATG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA), fisissorção de N<sub>2</sub> e adsorção de corante Rosa de Bengala (teste de hidrofobicidade) foram realizadas na qual confirmaram a sua funcionalização. O efeito de importantes parâmetros como pH de incubação, temperatura, carregamento inicial de proteína e tempo de contato no processo de adsorção da enzima e propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados foi avaliado. De acordo com os resultados obtidos, a funcionalização melhorou a capacidade de adsorção do suporte. Nas condições ótimas de adsorção (pH 5,0 tampão acetato de sódio 5 mM, 25°C e 150 min de incubação), máxima concentração de proteína imobilizada de 21,9 ± 0,1 mg/g de suporte foi observado. O biocatalisador preparado exibiu máxima atividade na hidrólise de azeite de oliva emulsificado de 630,3 ± 5,8 UI/g. A adsorção de LTL em Octil-SiO<sub>2</sub> foi um processo espontâneo e de fisissorção ( $-20,4 \text{ kJ/mol} \leq \Delta G \leq -7,6 \text{ kJ/mol}$ ). Os dados experimentais de adsorção foram bem ajustados ao modelo de isoterma de Langmuir ( $R^2 = 0,9952$ ). A atividade catalítica do biocatalisador preparado em reações em meio orgânico foi também avaliada na síntese de ésteres cetílicos (octanoato de cetila, estearato de cetila e oleato de cetila) por reação de esterificação em meio de hexano. A síntese de estearato de cetila, éster selecionado neste estudo, foi otimizada empregando um delineamento composto central rotacional (DCCR). Nas condições ótimas de reação (64°C, concentração de biocatalisador 21% m/v, 170 rpm e razão equimolar ácido:álcool – 1:1), máxima porcentagem de conversão da ordem de 90% foi observado após 60 min de reação. Após 9 ciclos sucessivos de reação, o biocatalisador reteve 90% de sua atividade inicial. Estes resultados mostram a promissora aplicação do suporte preparado em adsorção de lipase e aplicação em biocatálise (reações de hidrólise e esterificação).

**Palavras-chave:** Sílica de casca de arroz. Funcionalização. Lipase. Adsorção. Síntese de biolubrificante.

## ABSTRACT

Rice husk silica (RHS) has been extracted by a hydrothermal process and functionalized with triethoxy(octyl)silane (OCTES) to produce a hydrophobic support (Octyl-SiO<sub>2</sub>) to be used in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) via interfacial activation. The support was characterized by particle size, X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electronic microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), elemental analysis (CHN), N<sub>2</sub> physisorption analysis and Rose Bengal dye adsorption, thus confirming their functionalization. Effect of pH, temperature, initial protein loading and contact time on the adsorption process has been systematically evaluated. According to results, RHS functionalization improved the TLL adsorption capacity. Under optimal conditions (5 mM buffer sodium acetate pH 5.0, 25 °C and 150 min of incubation), maximum immobilized protein loading of 21.9 ± 0.1 mg/g of support was observed. Maximum catalytic activity in olive oil emulsion hydrolysis was 630.3 ± 5.8 IU/g. TLL adsorption was a spontaneous and physisorption process ( $-20.4 \text{ kJ/mol} \leq \Delta G \leq -7.6 \text{ kJ/mol}$ ). Experimental data on Octyl-SiO<sub>2</sub> adsorption were well-fitted to Langmuir isotherm model ( $R^2 = 0.9952$ ). It was also examined whether these biocatalysts could synthesize cetyl esters (cetyl octanoate, cetyl stearate and cetyl oleate) via esterification reaction. It was found that cetyl stearate synthesis required a reaction time of 100-110 min to attain maximum conversion percentage. Cetyl stearate synthesis was optimized using a central composite rotatable design (CCDR). Under optimal experimental conditions (64 °C, biocatalyst concentration of 21% m/v, 170 rpm and acid:alcohol equimolar ratio – 1:1), maximum ester conversion percentage of around 90% after 60 min of reaction was observed. After nine successive cycles of reaction in a batch system, the biocatalyst retained 90% of its original activity. These results show the potential application of the support obtained in lipase immobilization and its use as biocatalyst in hydrolysis and esterification reactions.

**Keywords:** Rice husk silica. Functionalization. Lipase. Adsorption. Biolubricant synthesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reação de esterificação de um ácido carboxílico e um álcool.....	20
Figura 2 -	Reação de transterificação de um éster e um álcool.....	20
Figura 3 -	Mecanismo de ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos.....	23
Figura 4 -	Esquema representativo das reações de esterificação catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO <sub>2</sub> .....	37
Figura 5 -	Esquema representativo da funcionalização da SiO <sub>2</sub> a partir da casca do arroz com OCTES e a adsorção física da LTL no suporte.....	41
Figura 6 -	Padrões de DXR para SiO <sub>2</sub> e Octil-SiO <sub>2</sub> .....	42
Figura 7 -	Análises de ATG da SiO <sub>2</sub> e Octil-SiO <sub>2</sub> e ar atmosférico.....	43
Figura 8 -	Imagem 3D da MFA para SiO <sub>2</sub> e Octil-SiO <sub>2</sub> .....	44
Figura 9 -	Imagens de MEV de SiO <sub>2</sub> e Octil-SiO <sub>2</sub> .....	45
Figura 10 -	Modelos não lineares de isotermas de adsorção da LTL imobilizada em SiO <sub>2</sub> e Octil-SiO <sub>2</sub> a 25°C.....	50
Figura 11 -	Efeito do tempo de incubação na adsorção de LTL em Octil-SiO <sub>2</sub> empregando carregamento inicial de proteína de 30 mg/g de suporte.....	53
Figura 12 -	Efeito do tempo de reação na síntese de ésteres cetila por reação de esterificação em meio hexano catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO <sub>2</sub> .....	54
Figura 13 -	Efeito do excesso de álcool cetílico na esterificação do estearato de cetila, nas condições ótimas de reação, catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO <sub>2</sub> .....	59
Figura 14 -	Efeito da adição de peneira molecular na esterificação do estearato de cetila, nas condições ótimas de reação, catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO <sub>2</sub> .....	61
Figura 15 -	Efeito do tempo na esterificação do estearato de cetila, em meio hexano, catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO <sub>2</sub> , nas condições ótimas de reação.....	62
Figura 16 -	Teste de estabilidade operacional da LTL imobilizada em Octil-SiO <sub>2</sub> , na síntese do estearato de cetila, nas condições ótimas de reação.....	63

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Caracterização de sílica não funcionalizada ( $\text{SiO}_2$ ) e funcionalizada com grupo octil (Octil- $\text{SiO}_2$ ).....	46
Tabela 2 - Parâmetros de imobilização da LTL imobilizada em partículas de sílica não funcionalizada ( $\text{SiO}_2$ ) e funcionalizada com grupo octil (Octil- $\text{SiO}_2$ ).....	47
Tabela 3 - Influência do pH nos parâmetros de imobilização da LTL via adsorção física em Octil- $\text{SiO}_2$ .....	48
Tabela 4 - Influência da concentração inicial de proteína nos parâmetros de imobilização de LTL via adsorção física em Octil- $\text{SiO}_2$ .....	49
Tabela 5 - Determinação de parâmetros de isoterma para adsorção física de LTL em Octil- $\text{SiO}_2$ .....	51
Tabela 6 - Matriz do DCCR utilizado para investigar o efeito das variáveis independentes na esterificação do estearato de cetila.....	56
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA).....	58

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- AE - Atividade Específica
- AH - Atividade Hidrolítica
- BJH - Modelo Barrett-Joyner-Halenda
- DRX - Difração de Raio X
- GPTMS - Glicidoxi Propil Trimetóxi Silano
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
- LTL - Lipase de *Thermomyces lanuginosus*
- MER - Média dos Erros Relativos
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- MFA - Microscopia de Força Atômica
- OCTES - Trietóxi(octil)silano
- PI - Proteína Imobilizada
- RB - Rosa de Bengala
- ATG - Análise Termogravimétrica
- DCCR - Delineamento composto central rotacional

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1	LUBRIFICANTES .....	17
2.2	BIOLUBRIFICANTES .....	18
2.3	ROTAS PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES SINTÉTICOS.....	19
2.3.1	Obtenção de ésteres via catálise química .....	19
2.3.2	Obtenção de ésteres via catálise enzimática .....	21
2.4	LIPASES .....	23
2.5	ADSORÇÃO FÍSICA .....	26
2.6	SÍLICA DA CASCA DO ARROZ.....	28
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	MATERIAIS .....	30
3.2	PEPRAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA VIA PROCESSO HIDRITÉRMICO .....	30
3.3	FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA COM PRECURSOR AL- COXILISANO .....	30
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA FUNCIONALIZADA E NÃO FUNCIONALIZADA .....	31
3.5	PROCEDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DA LTL VIA ADSORÇÃO FÍSICA....	32
3.5.1	Efeito da funcionalização do suporte.....	32
3.5.2	Efeito do pH.....	32
3.5.3	Efeito da temperatura .....	33
3.5.4	Efeito do carregamento inicial de proteína: Estudos de isoterma de adsorção	33
3.5.5	Efeito do tempo de contato.....	35
3.6.	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO.....	35
3.7	SÍNTESE DOS ÉSTERES DE CETILA .....	37

3.8	Otimização da síntese de estearato de cetila por delineamento experimental..	38
3.8.1	Efeito da razão molar ácido:álcool na síntese de éster .....	39
3.8.2	Efeito da concentração de peneira molecular na síntese de éster .....	39
3.8.3	Efeito do tempo de reação na síntese de éster .....	39
3.8.4	Teste de estabilidade operacional.....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE SÍLICA FUNCIONALIZADA E NÃO FUNCIONALIZADA .....	42
4.2	EFEITO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SiO <sub>2</sub> NA IMOBILIZAÇÃO DA LTL .....	46
4.3	EFEITOS DO PH NA IMOBILIZAÇÃO DA LTL .....	47
4.4	EFEITO DA TEMPERATURA NA IMOBILIZAÇÃO DA LTL .....	48
4.5	EFEITO DO CARREGAMENTO INICIAL DE PROTEÍNA: ESTUDOS DE ISOTERMA DE ADSORÇÃO .....	48
4.6	EFEITO DO TEMPO DE CONTATO NA IMOBILIZAÇÃO DE LTL .....	52
4.7	SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTES POR ESTERIFICAÇÃO (ÉSTERES DE CETILA).....	53
4.8	OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DO ESTEARATO DE CETILA POR DCCR .....	55
4.8.1	Efeito da razão molar ácido:álcool na síntese de éster .....	58
4.8.2	Efeito da peneira molecular na síntese de éster .....	60
4.8.3	Efeito do tempo de reação na síntese de éster. ....	61
4.8.4	Teste de estabilidade operacional.....	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são um grupo versátil de enzimas que catalisam uma série de reações em sistemas aquoso e não-aquoso como hidrólise, esterificação, transesterificação e interesterificação (KAPOOR et al., 2012). Estas enzimas têm sido utilizadas na produção de importantes ésteres como biodiesel, aromas e fragrâncias, emulsificantes, ceras e lipídeos estruturados (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KAPORR et al., 2012). A aplicação destas enzimas em escala industrial, principalmente na indústria oleoquímica, requer a imobilização em suportes sólidos que facilita a sua separação do meio de reação e permite seu reuso. Além disso, a estratégia de imobilização aumenta a estabilidade térmica destas enzimas por incubação em solventes orgânicos e melhora a atividade catalítica em meios não aquosos (ADLERCREUTZ, 2013; ZHAO et al., 2015). Neste sentido, diferentes protocolos de imobilização, como adsorção, encapsulação, ligação cruzada e ligação covalente em suportes ativados têm sido utilizados na preparação de biocatalisadores heterogêneos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KAPORR et al., 2012). O protocolo mais comum de imobilização na estabilização de lipases de diferentes fontes é ainda a adsorção física em suportes hidrofóbicos (mecanismo de ativação interfacial em superfícies hidrofóbicas) devido ao seu baixo custo, fácil operação, requerimento de condições brandas (baixa força iônica e temperatura ambiente), fácil regeneração do suporte após a inativação da enzima utilizando agentes de dessorção como guanidina e tensoativos (KAPOOR et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

Uma variedade de suportes (naturais e/ou sintéticos e/ou orgânicos ou inorgânicos) tem sido aplicada com sucesso na preparação de biocatalisadores heterogêneos via adsorção física de lipases. Entre eles, materiais inorgânicos (suportes à base de sílica, alumina, titânio, zircônia, cerâmicas, partículas magnéticas, etc.) têm atraído grande atenção devido às suas importantes características como alta estabilidade em solventes orgânicos, fácil funcionalização com uma grande variedade de compostos (como agentes silanos ou líquidos iônicos), elevada área superficial e diâmetro de poro e excelentes propriedades mecânicas que permitem aplicá-los em uma grande faixa de condições experimentais (HOMAEI et al., 2013; GHOLAMZADEH et al., 2017; ZUCCA et al., 2014). Materiais como sílica e vidro de porosidade controlada têm sido

os suportes inorgânicos mais preferidos na preparação de biocatalisadores via adsorção física de lipases (ZUCCA et al., 2014). Estes suportes podem ser adquiridos comercialmente por diferentes companhias no mercado internacional (ex. Sigma-Aldrich e Chiral Vision, etc.), sintetizados utilizando a técnica sol-gel com diferentes precursores silanos ou preparados por meio de processos termoquímicos utilizando resíduos do setor agroindustrial como bagaço de cana de açúcar, cascas de arroz, entre outros (CARVALHO et al. 2015; LIMA et al., 2015 SINGH et al., 2014 RAO et al. 2012; VAI-BHAV et al., 2015; VESCOVI et al., 2016; 2017).

Sílica obtida a partir de resíduos agroindustriais, especialmente da casca do arroz, tem sido aplicada como suplemento para a produção de concreto, preparação de nanocompósitos dentários, adsorvente na remoção de poluentes encontrados em rejeitos industriais (corantes, íons e CO<sub>2</sub>) (Cui et al., 2017; MOR et al., 2016; ZHANG et al., 2017), produção de materiais de baterias e supercapacitores devido ao seu baixo custo, excelentes propriedades físico-químicas e fácil acessibilidade em vários países ((LIU et al., 2015; SHEN, 2017). Por outro lado, a sua aplicação como potencial suporte na preparação de biocatalisadores ativos e estáveis por imobilização de lipase ainda é pouco relatado na literatura especializada (ZAINALABIDIN et al., 2015).

A produção brasileira de arroz em 2017/2018 será de 8 milhões de toneladas (WORLD RICE PRODUCTION 2017/2018, 2017). A casca do arroz constitui cerca de 20% m/m dos grãos de arroz e sua produção está estimada em 1,6 milhões de toneladas o que será um grande problema ambiental para o país (MAYER et al. 2015). Portanto, é necessário encontrar aplicações promissoras do ponto de vista industrial para este importante resíduo brasileiro. Neste contexto, o objetivo geral deste estudo consistiu na preparação, funcionalização, caracterização e aplicação para estas partículas de SiO<sub>2</sub> oriundas da casca do arroz como suporte para imobilização da lipase de *Thermomyces laniginosus* (LTL) via adsorção hidrofóbica. Neste trabalho, LTL foi selecionada como lipase modelo devido à sua alta atividade em ambos ambientes aquoso (hidrólise de ésteres) e não-aquoso (síntese de ésteres) (ALVES et al., 2017; MIRANDA et al., 2014;).

Levando em consideração estes aspectos, o objetivo geral do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas:

- a) Preparação de SiO<sub>2</sub> a partir da casca de arroz via processo hidrotérmico e funcionalização com trietóxi(octil)silano (OCTES) – Octil-SiO<sub>2</sub>;

- b) Caracterização das propriedades físico-químicas do suporte não funcionalizado e funcionalizado por diferentes técnicas;
- c) Imobilização de LTL em Octil-SiO<sub>2</sub> e avaliação da influência importantes fatores no processo de adsorção – Estudos de isoterma e mecanismo de adsorção;
- d) Aplicação dos biocatalisadores preparados na síntese de ésteres de cetila via reação de esterificação em meio com solvente orgânico.
- e) Otimização da síntese do estearato de cetila por delineamento central composto rotacional (DCCR);
- f) Teste de estabilidade operacional do biocatalisador preparado na síntese do éster após sucessivos ciclos de reação nas condições experimentais previamente otimizadas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lubrificantes

Durante os 10 últimos anos, o mercado global de lubrificantes tem sofrido mudanças dramáticas. A demanda mundial por lubrificantes tem chegado aproximadamente a 35 milhões de toneladas por ano desde 1991. Uma estimativa de consumo em 2016 foi que 39,4 milhões de toneladas foram consumidos em todo mundo, sendo que 56% foram lubrificantes automotivos, 32% lubrificantes industriais e 12% em processamento de óleos (<http://portallubes.com.br>). A projeção de crescimento até 2022 está para 43,87 milhões de toneladas com uma taxa anual de crescimento estimada em 2,4% ao ano (<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lubricants-market>). Um interesse significativo tem sido voltado para melhorar o meio ambiente, a confiabilidade, durabilidade e eficiência energética nas indústrias em geral. Desenvolver novas soluções tecnológicas, como a introdução de materiais leves, combustíveis menos nocivos, combustão controlada de combustível e gases de escape mais eficientes após o tratamento, são possíveis meios para diminuir os problemas ambientais trazidos por veículos e máquinas (GERBIG et al., 2004). Reduzir o desgaste e a fricção é um elemento chave para diminuir as perdas de energia, particularmente nos motores e trens. Os óleos minerais têm sido usados como lubrificante nos motores a combustão por um longo tempo. No entanto, como produto da destilação de petróleo bruto, óleos minerais só podem ser usados enquanto o petróleo bruto estiver disponível. Além disso, a eliminação de óleos minerais leva à poluição de ecossistemas aquáticos e terrestres (SSEMPEBWA et al., 2009).

O aumento dos preços do petróleo, o esgotamento da reserva de petróleo bruto no mundo e a demanda para proteger o meio ambiente contra poluição causada por óleos lubrificantes e seu derramamento descontrolado, tem renovado o interesse no desenvolvimento de lubrificantes alternativos. Os óleos biolubrificantes são percebidos como alternativas aos óleos minerais porque eles possuem certas propriedades técnicas naturais e são biodegradáveis. Comparado com óleos minerais, à base de óleo vegetal, os biolubrificantes apresentam geralmente alta lubricidade, alto índice

viscosidade, elevado ponto de fulgor e baixas perdas evaporativas (ALVES et al., 2013; NAGENDRAMMA et al., 2012).

As lubrificações podem ser obtidas a partir de biolubrificantes devido às suas cadeias de ácidos graxos de cadeia longa e à presença de grupos polares na estrutura do óleo vegetal (ATABANI et al., 2013; QUINCHIA et al., 2014). O principal propósito da lubrificação é reduzir o desgaste e o calor resultantes do contato entre as superfícies em movimento, que nada mais é do que reduzir o coeficiente de fricção entre duas superfícies de contato, prevenir a ferrugem e o nível de oxidação, atuar como isolador em aplicações de transformação e atuar como um isolante contra sujeiras, pó e água. Um lubrificante é uma substância que reduz a fricção e o desgaste pelo provimento de um filme protetor entre duas superfícies em movimento e a lubrificação ocorre quando duas superfícies são separadas por um filme lubrificante. Lubrificantes estão disponíveis nas formas líquida e sólida, sendo que um bom lubrificante exhibe as seguintes características: alto índice de viscosidade, alto ponto de ebulição, estabilidade térmica, baixo ponto de congelamento, capacidade de prevenir corrosão e alta resistência a oxidação.

Óleo vegetal pode ser obtido a partir de sementes oleoginosas que estão disponíveis através do mundo todo. Segundo relatos, 350 culturas oleoginosas estão disponíveis em todo o mundo. O óleo vegetal pode ser comestível e não-comestível. Exemplos incluem o jatobá, karanja, neem, farelo de arroz, colza, castor, linhaça, mahua, palmeira, girassol, coco, soja, azeitona e canola (Shahabuddin et al., 2013; Ong et al., 2011). Muitas pesquisas têm apontado o óleo vegetal como combustível de motor, mas poucas tem apontado óleos vegetais como base para lubrificantes de motores automotivos. Nas últimas décadas inúmeras pesquisas tem discutido o uso de biolubrificantes como alternativa em aplicações automotivas. Entretanto, poucas destas pesquisas tem analisado e revisado estes biolubrificantes.

## 2.2 Biolubrificantes

Os biolubrificantes são oriundos de plantas como palmeiras, soja, girassol, colza e coco (KUMAR et al., 2011). Biolubrificantes também podem ser feitos de és-

teres sintéticos e óleos de petróleo que satisfaçam critérios estabelecidos de biodegradabilidade e toxicidade. São geralmente considerados como lubrificantes com alta biodegradabilidade, bem como baixa toxicidade humana e ambiental.

Biodegradabilidade é a capacidade de um material ser degradado por microrganismos. A biodegradabilidade é diretamente influenciada pelo óleo base dos lubrificantes e depende da composição química do composto, que varia durante a sua aplicação. Isso significa que quando o lubrificante é submetido a fatores como ar, temperatura, metais, umidade e pressão, sua composição química pode ser alterada. Os produtos baseados em óleos vegetais são os que melhor atendem os requisitos de lubrificantes ambientalmente compatíveis. A sua biodegradabilidade resulta da decomposição por micro-organismos em produtos não tóxicos (CO<sub>2</sub> e água). Dependendo da rota de produção escolhida para obtenção de um biolubrificantes, pode-se atender com mais eficiência os requisitos ambientalmente favoráveis para o ecossistema.

### 2.3 Rotas de produção de ésteres sintéticos

Ésteres são importantes compostos químicos, atuando como intermediários na síntese de medicamentos, plastificantes, lubrificantes, cosméticos e fármacos (CHOWDHURY et al., 2014; LAGE et al., 2016; VESCOVI et al., 2017; WANG et al., 2012). Os ésteres sintéticos são substâncias que apresentam uma combinação de excelente desempenho técnico com propriedades ecológicas satisfatórias por se tratarem de compostos de fácil degradação, além de possuírem baixa toxicidade aquática. Além disso, conferem alta estabilidade química às moléculas quando comparados aos ésteres de glicerol, por exemplo, por apresentarem ao menos um átomo de carbono quaternário em sua cadeia.

#### 2.3.1 Obtenção de ésteres via catálise química

Na produção de ésteres simples a partir de álcoois de cadeia curta, como metanol, etanol ou butanol e triglicerídeos de origem natural, os catalisadores mais

utilizados são hidróxido de sódio ou potássio, hidróxidos e alcóxidos de metais, carbonatos, acetatos e diferentes ácidos, por meio de reações de esterificação (Figura 1) ou transesterificação (Figura 2).

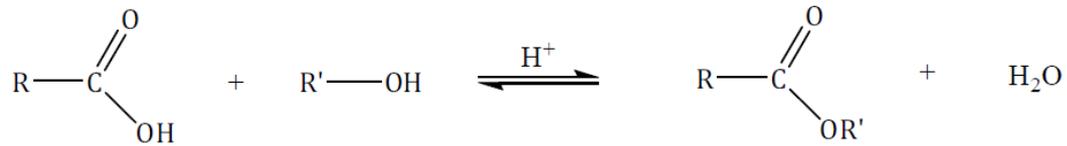


Figura 1 - Reação de esterificação de um ácido carboxílico com um álcool.

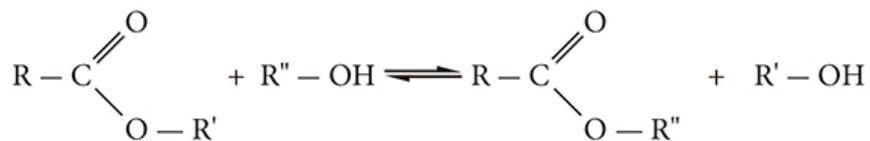


Figura 2 - Reação de transesterificação de um éster e um álcool.

Fonte: Do autor.

Uma produção economicamente viável de ésteres em escala industrial deve atender, no mínimo, aos seguintes critérios: bom rendimento, poucos subprodutos, balanço energético favorável, pequeno impacto no meio ambiente e simplicidade. Entretanto, apenas poucos dentre os inúmeros processos publicados na literatura especializada, de fato, atendem a esses requisitos (LÄMSA, 1995).

A transesterificação é o processo que utiliza um álcool (como metanol ou etanol) na presença de um catalisador (como hidróxido de sódio ou de potássio) para quebrar quimicamente a molécula do óleo vegetal em seus ésteres metílico ou etílico, com glicerina como subproduto. O óleo vegetal transesterificado é chamado de biodiesel, devido ao seu uso como combustível para motores a diesel. Um grande número de reações de transesterificação tem sido reportado com álcoois como metanol, etanol e isopropanol, para a obtenção de ésteres de usos comerciais como biodiesel, cosméticos e lubrificantes (ANAND et al., 1998). As poucas reações de transesterificação reportadas utilizando álcoois superiores com 8 a 14 carbonos se dão para a produção de lubrificantes.

Os mais usualmente utilizados para produzir óleos lubrificantes resultam da reação de ácidos carboxílicos e álcoois de cadeia longa, compostas por oito ou mais átomos de carbono (CHOWDHURY et al., 2014). O grupo éster apresenta efeito direto

nas propriedades físicas dos lubrificantes, atuando principalmente na redução da volatilidade (DORMO et al., 2004).

A maior parte dos ésteres de álcoois superiores é obtida por um processo em duas etapas. Na primeira etapa, o óleo vegetal é hidrolisado ao seu ácido graxo correspondente por uma variedade de métodos. Os ácidos graxos são, então, esterificados, em uma segunda etapa, com o álcool correspondente. Ou seja, esse processo consiste em consecutivas reações reversíveis nas quais o triglicerídeo é convertido passo a passo em diglicerídeo, monoglicerídeo e, finalmente, libera uma molécula de glicerol. Em cada passo desse processo, é obtido um 1 mol de éster de ácido graxo. As reações de esterificação e transesterificação podem ser catalisadas por ácidos, bases e também por enzimas (AKERMAN et al., 2011; GRYGLEWICZ et al., 2013; TAKISAWA et al., 2013). O processo de obtenção de biolubrificantes por reações catalisadas por enzimas, vem se tornando cada vez mais interessante do ponto de vista ambiental, e por consequência, também chamando a atenção dos processos industriais, pois auxilia o setor industrial no combate a poluição ambiental, além de outras vantagens no processo produtivo.

### 2.3.2 Obtenção de biolubrificantes via catálise enzimática

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios reacionais não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos, catalisadas por lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com sua alta estabilidade em solventes orgânicos; o fato de não requerer a presença de cofatores e por possuir uma larga especificidade pelo substrato e exibir uma alta enantiosseletividade (BONDIOLI, 2005; LINDEMANN et al., 2012; WHITBY, 2015). O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial.

Lubrificantes e sua produção necessitam ser ambientalmente modificados e um alto nível é requerido para estas produções. O ambiente precisa ser protegido contra a poluição causada pelos lubrificantes a base de petróleo, já que aproximadamente 50% dos lubrificantes vendidos pelo mundo terminam no meio ambiente na forma gasosa (volatilização), derramamentos e perdas nas aplicações em geral. Em adição, alta qualidade tecnológica é exigida no desenvolvimento destes produtos.

Após a 2ª Guerra Mundial, o desenvolvimento de fluidos à base de éster de elevado desempenho foi intimamente associada ao desenvolvimento da turbina a gás da aviação. Ésters sintéticos foram aumentando significativamente sua popularidade como lubrificantes a base de óleo devido às suas propriedades técnicas superiores, como sua alta qualidade, a ausência de toxicidade, sua excelente biodegradação e sua síntese não baseada no petróleo (LAMSA, 1995).

Diferentes ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem (VULFSON, 1994). Um desenvolvimento relativamente novo e promissor na produção de óleos lubrificantes biodegradáveis e aditivos que fazem uso de esterificação enzimática com lipase como catalisador tem sido sugerido desde o final da década de 1990 (KOBAYASHI et al., 2004).

A produção de ésteres sintéticos a partir de fontes renováveis tem sido realizada com a aplicação de catalisadores homogêneos e heterogêneos (AKERMAN et al., 2011; BRESSANI et al., 2015; NAGENDRAMMA et al., 2012; LAGE et al., 2016). Do ponto de vista industrial, catalisadores heterogêneos são mais atrativos devido à maior facilidade de recuperação e baixa geração de resíduos químicos (BORGES et al., 2012). Dentre eles, a aplicação de lipases imobilizadas como catalisador heterogêneo tem-se mostrado bastante promissor em função da alta atividade, especificidade para substratos naturais e sintéticos e requerimento de condições brandas de reação (ADLERCREUTZ, 2013; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010). Além disso, a síntese enzimática de ésteres evita a formação de componentes de coloração escura produzidos em reações empregando catalisadores CLheterogêneos ácidos, como resina funcionalizada com ácido sulfônico que exigem etapas subsequentes de purificação como branqueamento e desodorização (Akerman et al., 2011).

A síntese enzimática de ésteres lubrificantes tem sido preferencialmente conduzida em meio orgânico, em sistema com ou sem solvente (AKERMAN et al., 2011; BASSI et al., 2016; BRESSANI et al., 2015; GRYGLEWICZ et al., 2013; LAGE et al., 2016). Nestas condições, uma forte interação enzima/suporte não é necessária devido à insolubilidade da enzima neste meio. Deste modo, a adsorção física em suportes altamente hidrofóbicos é um protocolo adequado para imobilizar lipases (Adlercreutz, 2013; Bassi et al., 2016; Lage et al., 2016). Estas enzimas são imobilizadas por interação reversível da zona hidrofóbica da “tampa” e da área hidrofóbica próxima aos seus sítios ativos com a superfície dos suportes (mecanismo de ativação interfacial). Eles reconhecem estes suportes como semelhantes aos seus substratos naturais (gotículas de óleo) (ADLERCREUTZ, 2013; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010).

Este protocolo de imobilização pode promover ainda a hiperativação, purificação (adsorção seletiva da enzima) e estabilização de lipases em conformação aberta. Além disso, estes suportes podem ser reutilizados após a inativação da molécula de lipase por dessorção utilizando vários produtos químicos (detergentes, guanidina, etc.) (BASTIDA et al., 1998; CABRERA et al., 200; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). O mecanismo de ativação interfacial de lipases em superfícies hidrofóbicas é mostrado na Figura 3.

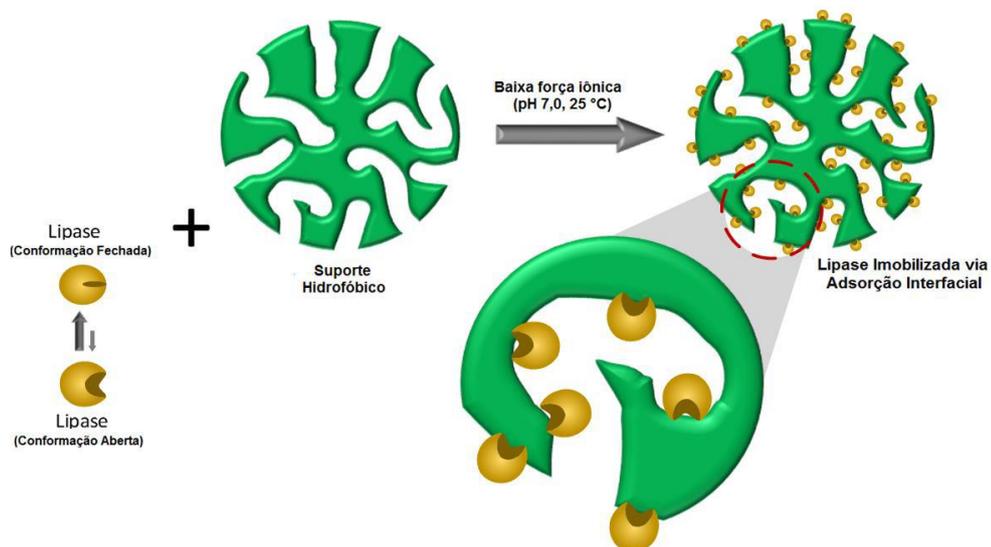


Figura 3 - Mecanismo de ativação interfacial de lipases em suporte hidrofóbicos.

Fonte: Do autor.

## 2.4 Lipases

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (JAEGER et al., 1998). São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (KAZLAUSKAS et al., 1998). Inicialmente, eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (KAZLAUSKAS et al., 1998; VULFSON, 1994). Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível (VULFSON, 1994). Atualmente, lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras. Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (KAZLAUSKAS et al., 1998; VULFSON, 1994).

O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo e o fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas é a "ativação interfacial", que relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, que formam emulsão. Lipases, diferentemente das esterases, são definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados (JAEGER et al., 1998).

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições micro aquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster) (YAHYA et al., 1998). Estes dois processos básicos po-

dem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise) e transesterificação, dependendo dos reagentes de partida utilizados na reação.

A LTL é a enzima termoestável responsável pela atividade lipolítica da Lipolase®, uma preparação comercial de lipase solúvel fornecida pela Novozymes, e é também disponível em forma imobilizada (Lipozyme TL IM®). Lipolase® é produzido por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* (CHRISTENSEN et al., 2003; PENG et al., 2002). É utilizada na modificação, hidrólise e transesterificação de óleos e gorduras, esterificação de ácidos graxos, acidólise ou interesterificação de óleos, resolução de misturas racêmicas, dentre outras (Fernandez-Lafuente, 2010). A LTL é constituída por uma única cadeia de 269 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 31.7 kDa, ponto isoelétrico (pI) de 4.4, estável na faixa de 20 a 50°C e com atividade máxima em pH em torno de 9.0 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A alta estabilidade da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) tem permitido o uso desta enzima na maioria dos meios reacionais disponíveis, desde o meio bifásico (com solvente orgânico) e o meio livre de solvente (DOMÍNGUEZ DE Maria et al, 2009). Dentre os processos que podem ser catalisados por esta enzima, a síntese de ésteres é o processo mais realizado. Ao contrário das reações baseadas em álcalis e ácidos, os produtos podem ser facilmente coletados e separados. O uso destas enzimas como catalisadores heterogêneos (imobilizadas em suportes hidrofóbicos) possibilitam o seu reciclo e a sua reutilização nos processos, podendo até operar de modo contínuo ou uso em bateladas subsequentes (DUPONT et al., 2009).

A maioria das lipases possuem uma propriedade estrutural comum: em um meio homogêneo, elas possuem seu sítio ativo separado do meio por uma cadeia polipeptídica chamada de tampa, cujas mudanças conformacionais controlam o acesso das moléculas de substrato ao sítio ativo. Na presença de uma interface hidrofóbica, que pode ser uma gota de óleo ou qualquer outro suporte hidrofóbico, a tampa se move, permitindo interações entre a face hidrofóbica e as áreas hidrofóbicas que cercam o sítio ativo (REIS et al., 2009). Desta forma, a lipase fica adsorvida nesta superfície (forma aberta) e o sítio ativo exposto ao meio reacional (Fernandez-Lafuente, 2010). Portanto, as conformações da tampa aberta ou fechada estão em um equilíbrio afetado pelas condições ambientais reacionais (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009).

Aproveitando o mecanismo catalítico, duas estratégias para a imobilização da lipase foram desenvolvidas com uma atividade melhorada: lipase adsorvida em suportes hidrofóbicos e lipase imobilizada por ligação covalente em suportes modificados quimicamente. Estas são as razões para a lipase imobilizada em suportes hidrofóbicos geralmente exibirem maior atividade que a enzima livre ou outras preparações de enzimas imobilizadas. Além disso, diferentes suportes com hidrofilicidade ou hidrofobicidade superficial diferentes irão alterar muito as propriedades enzimáticas, como a acessibilidade, atividade e seletividade (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 2010).

## 2.5 Adsorção Física

A técnica mais popular de imobilização em qualquer tipo de suporte de sílica porosa é a adsorção física. Este método é caracterizado pela sua simplicidade, porque uma funcionalização prévia da superfície do suporte não é tipicamente requerida. Desnaturação e/ou desativação da enzima pode ser evitada e então, a retenção da atividade catalítica da enzima imobilizada se torna muito alta (CAO, 2005).

A fisissorção de enzima em superfícies de sílica é governada pela interação de moções funcionais das cadeias enzimáticas com a superfície sólida. As principais forças dirigentes são interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e eletrostáticas (atração e repulsão).

Desde que as moléculas das enzimas são adsorvidas fisicamente somente na superfície da sílica, a lixiviação a partir do suporte pode ser desencadeada, até mesmo pelas menores mudanças nas condições reacionais, como alterações de temperatura, pH ou variações nas concentrações dos substratos (CAO, 2005). Embora a aplicação de sílicas seja atrativa na imobilização de enzimas, este suporte apresenta elevada capacidade de retenção de compostos hidrofílicos gerados em reações realizadas em meio orgânico, como na esterificação (moléculas de água) e transesterificação (moléculas de glicerol) por interação de ligações de ponte de hidrogênio com os grupos silanois (Si-OH) existentes em sua estrutura (MASOUMIFARD et al., 2015; SALIBA et al., 2016). A retenção destes compostos reduz drasticamente a atividade catalítica dos biocatalisadores, pois favorecem a dessorção da enzima e induzem a

formação de uma camada hidrofílica que minimiza a partição de substratos hidrofóbicos, como triacilgliceróis e ácidos graxos livres no seu microambiente. Para resolver estes problemas, diferentes estratégias são propostas para melhorar a ligação enzimática ao suporte, como modificações químicas na superfície do suporte de sílica por diferentes grupos funcionais por meio de ligações covalentes.

Frequentemente, interações físicas entre enzimas e suportes de sílica não são fortes o suficiente para manter as moléculas da enzima aderidas aos poros. A lixiviação enzimática é uma limitação crítica para o uso de suportes de sílica na sua forma pura. A modificação da superfície de sílicas é bem estabelecida, amplamente utilizada em imobilizações enzimáticas e a literatura oferece vários protocolos (CAO, 2005; ZHOU et al., 2012). A vantagem das modificações químicas na superfície do suporte é que a enzima é fortemente fixada, então a dessorção da enzima pelo suporte é minimizada, além da contaminação do produto pela enzima ser evitada (HARTMANN et al., 2010). A estabilidade operacional destes biocatalisadores também é aumentada na maioria dos casos, especialmente quando multipontos de ligação são alcançados no suporte (CAO, 2005; HARTMANN et al., 2010).

A sílica pode ser funcionalizada com diferentes grupos funcionais tais como: alquila, amino, carboxila, dentre outros, os quais possibilitam a orientação da enzima ao suporte por diferentes regiões (CARVALHO et al., 2015). A ativação da sílica ocorre quando um agente alcoxilano passa a ser quimicamente ligado covalentemente à sua superfície, cuja operação é denominada de funcionalização. A grande vantagem da utilização da sílica funcionalizada advém da possibilidade da reciclagem do substrato adsorvente (organo silano). Esta técnica de modificação promove um carregamento alto e mais homogêneo da superfície com grupos organo silanos.

A ativação da sílica pode ocorrer em uma única reação, como por exemplo, a síntese realizada por blanco et al. (2004) na ativação da sílica com octil trietóxi silano, ou então com a ativação sendo realizada por duas ou mais reações, como por exemplo, a realizada por Sales, Prado e Airoidi (2002) que, inicialmente, ativaram a sílica com GPTMS (glixidóxi propil trimetóxi silano) e depois realizaram outra reação com etileno diamina. A funcionalização do suporte de sílica por reação com trietóxi(octil)silano (OCTES) aumenta consideravelmente a hidrofobicidade do suporte, o que é atrativo para imobilização de lipases que possuem elevada afinidade com superfícies

altamente hidrofóbicas, melhorando a difusão de substratos hidrofóbicos ao microambiente do biocatalisador (BLANCO et al., 2004, BERNAL et al., 2015).

## 2.6 Sílica da casca do arroz

O dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ), mais conhecido como sílica, é um composto químico que pode ser encontrado na natureza puro ou na forma de minerais. Em estado puro é encontrado em rochas de quartzo, areia, arenitos e quartzitos. Como mineral apresenta-se em associações que dão origem a feldspatos, silicatos de magnésio e zircônia, dentre outros. A sílica é um composto muito utilizado na indústria química inorgânica, com grande ênfase na indústria cerâmica, principalmente como matéria-prima para fabricação de vidros, refratários, tubos cerâmicos, isolantes térmicos e abrasivos. Partículas de sílica são amplamente comercializadas por diferentes empresas, mas também podem ser produzidas pela técnica sol-gel empregando diferentes precursores silanos (HUANG et al., 2016; WANG et al., 2016). O custo de partículas de sílica pode variar de R\$ 1000,00/kg a R\$ 780,00 o grama (SIGMA-ALDRICH, 2016).

Motivados pela evolução tecnológica do beneficiamento do arroz, a casca de arroz, um resíduo da indústria de processamento de alimentos, se apresenta como uma alternativa promissora para obtenção de sílica, pois 20% em massa deste resíduo é composto por sílica (YU et al., 2014). Pesquisas sobre o potencial destas como fonte de sílica têm sido relatadas há vários anos, e estão fundamentadas no fato de que extraída a matéria orgânica e os compostos alcalinos e alcalino terrosos indesejáveis, cerca de 95% de sílica no estado amorfo pode ser obtida (HOUSTON, 1972). O interesse na extração da sílica a partir destes resíduos provém da potencialidade de ser obtida com elevada área de superfície específica e pureza (SOUZA et al., 1999). A sílica existente na casca do arroz, além do processo de simples combustão, pode ser obtida através do tratamento físico-químico com soluções de diferentes ácidos em várias concentrações, seguido de lavagem com água destilada e queima da parte orgânica a altas temperaturas (SOUZA et al., 2002). Com esta operação é possível solubilizar grande parte dos elementos sódio, potássio, ferro, manganês, cálcio e alumínio.

De acordo com a estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para a safra brasileira de arroz em 2017, 11,3 milhões de toneladas serão colhidas, montante 8,8% superior ao ano de 2016. A título de ilustração, esse montante permitiria ao país aumentar sua produção de sílica, introduzindo produtos mais sofisticados ao mercado e ao mesmo tempo, reduzindo o volume de importações. Durante o beneficiamento do arroz, são produzidos em média 23% em massa de casca de arroz como subproduto (MIMURA et al., 2010). Além disso, as nanopartículas de sílica obtidas apresentam elevada área superficial, entre 180 m<sup>2</sup>/g YU et al (2014) e 1184 m<sup>2</sup>/g Zainalabidin et al (2014), o que as tornam promissoras na produção de biocatalisadores. Estes suportes oferecem a possibilidade de imobilizar proteínas grandes, estáveis termicamente, mecanicamente e quimicamente, além de resistentes a ataques microbiológicos. Além disso, estes suportes de sílica exibem grupos funcionais suficientes em sua superfície para ligação da enzima ou para futuras modificações. Todas estas características os tornam candidatos promissores para imobilização enzimática.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi comprada da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A casca do arroz foi adquirida da empresa Arroz Rei de Ouro Ltda. (Itajubá, MG, Brasil). Trietóxi(octil)silano (OCTES) e Rosa de Bengala foram comprados da Sigma-Aldrich. Álcool cetílico, ácido oleico e octanóico também foram comprados da Sigma-Aldrich Co. e o ácido esteárico da Synth<sup>®</sup> (São Paulo, SP, Brasil). A peneira molecular UOP 3 Å (tamanho 1/16 pol) também foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. Albumina sérica bovina (BSA) foi adquirida da Rio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA). A goma arábica foi comprada da Synth<sup>®</sup> e o óleo de oliva (baixa acidez-Carbonel) foi adquirido em mercado local (Alfenas, MG, Brasil). Demais produtos químicos e solventes orgânicos foram da grade analítica adquiridos da Synth<sup>®</sup> e Vetec Química Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

#### 3.2 Preparação das partículas de sílica via processo hidrotérmico

As partículas de sílica foram preparadas segundo a metodologia descrita por Zang et al (2107), com pequenas modificações. Inicialmente, as cascas de arroz foram secas por aproximadamente 15 horas a 80°C. 30,000 g da casca de arroz seca foram refluxadas com 400 mL de solução de água deionizada com ácido clorídrico (35% m/m) na proporção de 9:1, respectivamente, por duas h a 120°C para remoção das impurezas metálicas. As cascas de arroz tratadas foram filtradas, lavadas com água deionizada e calcinadas em mufla a 700°C por 4 h para obter partículas de sílica. A porcentagem de rendimento de sílica foi de  $11,2 \pm 1,1\%$  com base na massa seca inicial.

#### 3.3 Funcionalização das partículas de sílica com precursor alcoxisilano

A preparação de Octil-SiO<sub>2</sub> com OCTES foi realizada segundo metodologia descrita por Vescovi et al. (2016). Uma suspensão contendo 1 g da sílica seca e 20 mL da mistura do precursor alcoxisilano OCTES e tolueno (na proporção de OCTES: tolueno de 1:10) foi mantida sob refluxo por 4 h a 120°C. O suporte funcionalizado foi

filtrado a vácuo e lavado com acetona, álcool e água destilada. Após a lavagem, o suporte foi mantido a 40°C por 24 h em estufa de secagem.

### 3.4 Caracterização das partículas de sílica funcionalizadas e não funcionalizadas

Os dados de Difração de Raio X (DRX) foram coletados no difratômetro Empyrean Panalytical usando radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ) na faixa de  $2\theta=5-50^\circ$ , no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química da UNIFAL - MG. Análises termogravimétricas (TG) foram realizadas com unidade SD Q600 (TA Instrumentos), no Laboratório de Química Inorgânica do Instituto de Química da Unifal-MG. As amostras em pó, com aproximadamente 10 mg, foram examinadas em atmosfera de ar sintético no intervalo de 30 a 900°C com razão de aquecimento de 10°C/min. Imagens de microscopia de força atômica (MFA) foram adquiridas usando microscópio Cypher Es (Asylum Research) com área superficial escaneada de 1 x 1  $\mu\text{m}$ . Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram adquiridas no equipamento Quanta 200 FEI sob vácuo operando na voltagem de 5kV. Ambas análises de MFA e MEV foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG - MG. As amostras secas utilizadas para análises de MEV foram revestidas com uma fina camada de ouro (10 nm). A área superficial específica foi determinada por adsorção de nitrogênio a 77 K utilizando o método Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T), fisissorção de  $\text{N}_2$ , com instrumento LMA-sorp com degaseificação a 250°C por 4 h antes da análise, realizada no Departamento de Química da UFMG - MG. O modelo Barrett-Joyner-Halenda (BJH) foi aplicado para determinar o volume de poro e o diâmetro médio de poro. A análise da distribuição do tamanho de partícula e tamanho de partícula média foi realizada no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) empregando o equipamento Mastersizer Microplus (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

A hidrofobicidade do suporte foi determinada por método de adsorção do corante Rosa de Bengala de acordo com a metodologia descrita por Vescovi et al (2016) com pequenas modificações, no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL - MG. 15 mL de solução do corante Rosa de Bengala (500  $\mu\text{g/mL}$ ) previamente preparada utilizando água deionizada foram incubados com 0,1 g do suporte em um agitador orbital sob agitação contínua (200 rpm) a 25 °C por 24 h. A absorbância obtida do sobrenadante antes e após o processo de adsorção foi medida espectrofotometricamente a

549 nm. A concentração do corante absorvido foi determinada utilizando a curva de calibração no intervalo de 0,25 a 5 µg/mL ( $R^2 = 0,99988$ ). Estes testes foram realizados em triplicata.

### 3.5 Procedimento de imobilização da LTL via adsorção física

A imobilização da LTL em Octil-SiO<sub>2</sub> foi realizada de acordo com prévios estudos realizados em nosso grupo (ALVES et al., 2017; MIRANDA et al., 2014). O procedimento de adsorção consistiu na preparação de uma suspensão contendo solução de LTL previamente preparada com solução tampão e suporte na proporção de 1:20 (m/v) (suporte/solução de LTL). A suspensão foi mantida sob agitação de 200 rpm em um agitador orbital. O biocatalisador preparado foi filtrado sob vácuo em funil de Buchner com papel filtro Whatman n°41 e lavado exaustivamente com água destilada. O processo de adsorção foi monitorado pela medição da concentração de proteína na solução do sobrenadante. Após, o biocatalisador imobilizado preparado foi estocado a 4 °C por 24 h. Neste estudo, o biocatalisador foi preparado com baixa força iônica (solução tampão de fosfato de sódio pH 5,0 a  $5 \times 10^{-3}$  mol/L) para evitar uma possível competição entre os íons obtidos a partir da solução e dos grupos iônicos provenientes da estrutura da enzima que interagem com a superfície do suporte.

#### 3.5.1 Efeito da funcionalização do suporte

O efeito da modificação química nos parâmetros de imobilização do suporte foi avaliado pelo uso da sílica não funcionalizada (SiO<sub>2</sub>) em relação ao suporte funcionalizado (Octil-SiO<sub>2</sub>). O procedimento de adsorção foi realizado em tampão acetato de sódio pH 5,0 com carregamento inicial de proteína de 5 mg/g para evitar problemas difusivos por 15 h de incubação a 25 °C.

#### 3.5.2 Efeito do pH

O efeito do pH entre 4 e 9 (tampão acetato de sódio pH 4,0 e 5,0, tampão fosfato de sódio pH 6,0, 7,0, 8,0 e tampão carbonato de sódio pH 9,0) sobre os parâmetros de imobilização também foi estudado. As suspensões foram mantidas sob agitação de 200 rpm por 15 h em shaker orbital.

### 3.5.3 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre os parâmetros de imobilização foi estudado no intervalo de 5 a 25°C, com incremento de 5°C. O procedimento de adsorção foi realizado utilizando tampão pH 5,0 (acetato de sódio  $5 \times 10^{-3}$  mol/L) e a suspensão enzima:suporte foi também mantida sob agitação de 200 rpm por 15 h em shaker orbital.

### 3.5.4 Efeito do carregamento inicial de proteína: Estudos de isoterma de adsorção

O efeito do carregamento inicial de proteína variando de 5 a 40 mg/g de suporte foi avaliado com o intuito de verificar a máxima concentração de proteína adsorvida. A adsorção foi realizada em pH 5,0 (tampão acetato de sódio  $5 \times 10^{-3}$  mol/L), por 15 h de incubação, sob agitação de 200 rpm a 25°C. Neste estudo, os dados experimentais foram ajustados a 5 diferentes modelos não lineares de isotermas para descrever estudos de equilíbrio da adsorção de LTL no suporte preparado, como: Langmuir (Eq. (1)), Freundlich (Eq. (2)), Temkin (Eq. (3)), Sips (Eq. (4)) e Redlich-Peterson (Eq. (5)) (Alves et al., 2017).

$$q_e = \frac{q_{\max} \times C_e}{K_L + C_e} \quad (1)$$

$$q_e = K_F \times C_e^{\frac{1}{n}} \quad (2)$$

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \times \ln(A_T \times C_e) \quad (3)$$

$$q_e = \frac{K_S \times C_e^{\beta_S}}{1 + a_S \times C_e^{\beta_S}} \quad (4)$$

$$q_e = \frac{K_R \times C_e}{1 + a_R \times C_e^g} \quad (5)$$

Em que:  $q_e$  é a capacidade de adsorção no equilíbrio (mg de proteína/g de suporte);  $C_e$  é definido como a massa residual de proteína por unidade de volume de solução de lipase (mg proteína/mL);  $q_{\max}$  é a capacidade de máxima de adsorção (mg proteína/g suporte);  $K_L$  é a constante de Langmuir relacionada a energia de adsorção

(mL/mg proteína);  $K_F$  é a constante isotérmica de Freundlich (mL/mg suporte);  $n$  é o expoente de Freundlich (sem dimensões);  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \times 10^{-3}$  kJ/mol.K);  $T$  é a temperatura experimental (298,15 k);  $A_T$  é a constante de ligação ao equilíbrio isotérmico de Temkin (mL/g suporte);  $b_T$  é a constante isotérmica de Temkin (J/mol);  $K_S$  é a constante de modelo isotérmico de Sips (mL/mg);  $\beta_S$  é o expoente de Sips (sem dimensão);  $\alpha_S$  é a constante modelo de Sips (mL/mg);  $K_R$  é a constante isotérmica de Redlich-Peterson (mL/mg);  $\alpha_R$  é a constante isotérmica de Redilch-Peterson (1/mg);  $g$  é o expoente de Redilch-Peterson (sem dimensão).

O modelo isotérmico que melhor descreve a adsorção da LTL no suporte Octil-SiO<sub>2</sub> foi baseado na determinação do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), a partir de regressão não linear e da média dos erros relativos (MER). A média entre os erros relativos e os valores preditos foi calculada usando a Eq. (6) (FOO et al., 2010):

$$MER = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{q_t^{\text{exp}} - q_t^{\text{calc}}}{q_t^{\text{exp}}} \right|_i \quad (6)$$

Em que:  $q_t^{\text{exp}}$  e  $q_t^{\text{calc}}$  são os carregamentos experimentais e calculados de proteína em determinados tempos de incubação, respectivamente, e  $N$  é o número de amostras.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para os modelos isotérmicos propostos foi calculado de acordo com a Eq. (7) (ANDERSON-SPRECHER, 1994):

$$R^2 = 1 - \left( \frac{SS_{\text{res}}}{SS_{\text{tot}}} \right) \quad (7)$$

Em que:  $SS_{\text{res}}$  é a soma residual dos quadrados e  $SS_{\text{tot}}$  é a soma total dos quadrados.

Estes parâmetros foram calculados como mostrados nas Eq. (8) e (9), respectivamente. Para o cálculo de  $SS_{\text{tot}}$ , foi necessário determinar o valor médio da concentração de proteína adsorvida num certo tempo  $t$  ( $\bar{q}_t$ ) – Eq. (10):

$$SS_{res} = \sum_{i=1}^N (q_t^{\text{exp}} - q_t^{\text{calc}})^2 \quad (8)$$

$$SS_{\text{tot}} = \sum_{i=1}^N (q_t^{\text{exp}} - \bar{q}_t)^2 \quad (9)$$

$$\bar{q}_t = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N q_t^{\text{exp}} \quad (10)$$

### 3.5.5 Efeito do tempo de contato

O efeito do tempo de contato na adsorção da LTL foi avaliado no carregamento, na qual foi observada a saturação do suporte Octil-SiO<sub>2</sub> (35 mg/g). O procedimento de adsorção foi conduzido em pH 5,0 (tampão acetato de sódio 5x10<sup>-3</sup> mol/L) e 25°C.

### 3.6 Determinação dos parâmetros de imobilização

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford empregando BSA como proteína padrão (Bradford, 1976). Concentração de proteína imobilizada foi determinada ( $q_e$  – mg/g de suporte) foi calculada segundo a Eq. (11) (Lage et al., 2016; Alves et al., 2017):

$$q_e = \frac{V \times (C_0 - C_e)}{m} \quad (11)$$

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

O método de determinação da atividade catalítica da LTL imobilizada foi baseado na hidrólise da emulsão do óleo de oliva (ALVES et al., 2017; MIRANDA et al., 2014). A emulsão foi preparada pela mistura de 1,25 g de óleo de oliva e 3,75 g de goma arábica a 3% m/m com 5 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 8,0 (100 x 10<sup>-3</sup> mol/L). A mistura foi inserida em frascos erlenmeyer de 125 mL e incubados em um agitador de banho convencional com controle de temperatura (37°C) a 200 rpm

por 5 minutos. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de 0,1 g da LTL imobilizada. Subseqüentemente, 10 mL de etanol a 95% m/m foram adicionados a esta mistura reacional e a mesma titulada com solução de NaOH 30 mM usando fenolftaleína como indicador, para a quantificação dos ácidos graxos liberados na reação de hidrólise. A atividade da lipase foi determinada como mostra a Eq. (12). Uma unidade internacional (UI) de atividade foi definida como sendo a massa de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo livre por minuto de reação. Neste estudo, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$AH (IU / g) = \frac{(V_s - V_c) \times M \times 10^3}{t \times m} \quad (12)$$

Em que:  $AH$  é a atividade hidrolítica (UI/g biocatalisador);  $V_s$  é o volume de Soda utilizado para titular a amostra (mL);  $V_c$  é o volume de soda utilizado para titular a amostra controle (mL);  $M$  é a concentração molar da solução de NaOH utilizada na titulação (mol/L),  $t$  é o tempo de reação (min) e  $m$  é a massa do biocatalisador (g).

A atividade específica (AE) foi determinada de acordo com a Eq. (13) (Lage et al., 2016; Alves et al., 2017):

$$AE = \frac{AH}{q_e} \quad (13)$$

Em que:  $AH$  é a atividade hidrolítica aparente do biocatalisador preparado (UI/g biocatalisador).

A constante de equilíbrio ( $K_e$ ) de adsorção foi determinada como sendo a relação entre a concentração de proteína imobilizada ( $q_e$ ) e a concentração de proteína residual na solução sobrenadante ( $C_e$ ) no equilíbrio, de acordo com a Eq. (14):

$$K_e = \frac{q_e}{C_e} \quad (14)$$

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ -kJ/mol) foi calculada como mostrado na Eq. (15):

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_e \quad (15)$$

Em que:  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ/mol.K}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta de adsorção (298,15 K).

### 3.7 Síntese de ésteres de cetila

A atividade catalítica, do biocatalisador imobilizado em meio orgânico, foi medida na síntese de três diferentes ésteres de cera (biolubrificantes) via reação de esterificação dos ácidos octanóico, esteárico e oleico com álcool cetílico em meio de hexano. A Figura 4, mostra um esquema representativo das reações de esterificação desenvolvidas neste trabalho.

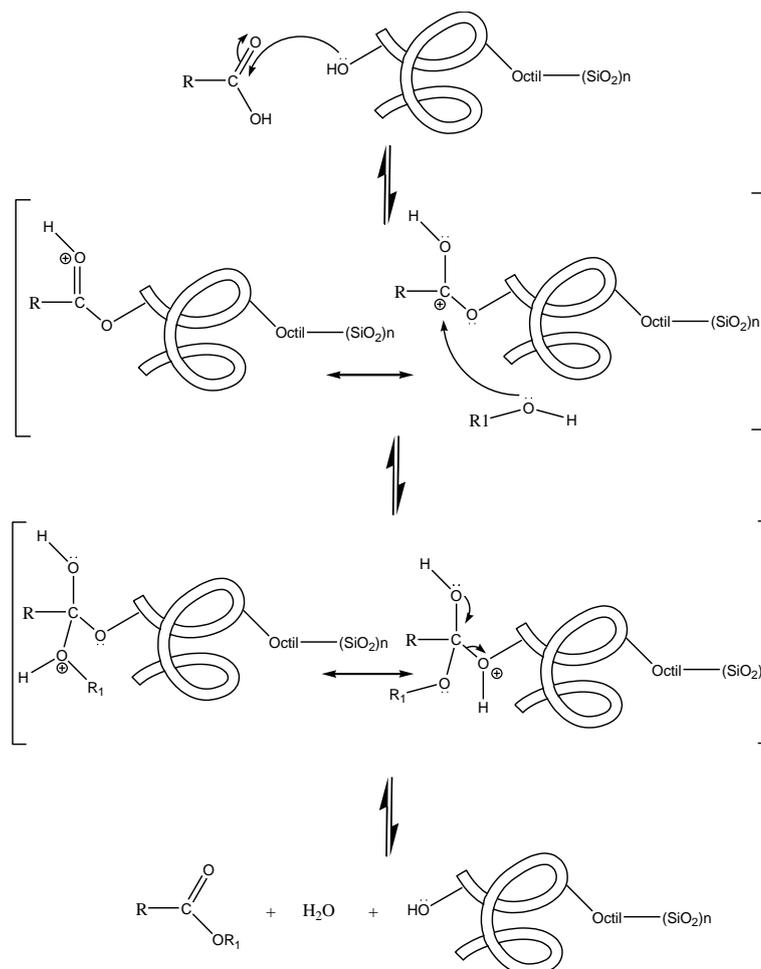
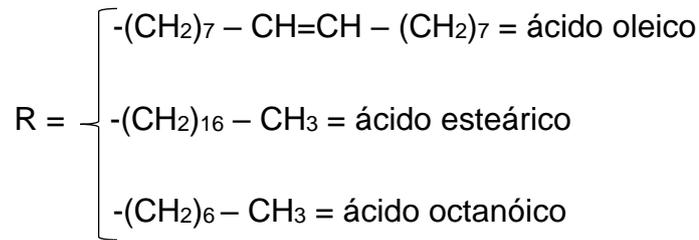


Figura 4 - Esquema representativo da reação de esterificação catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub>.

Fonte: Do autor.

Em que:



As reações foram conduzidas em frascos de vidro fechados com capacidade para 100 mL contendo 10,00 g da mistura reacional (1 mol/L de cada reagente) incubada em um banho termostatizado com agitação (200 rpm) a 40°C. A reação foi iniciada pela adição de 0,600 g do biocatalisador imobilizado preparado previamente nas condições ótimas – carregamento inicial de proteína oferecida de 35 mg/g ( $q_e = 21,9 \pm 0,1$  mg/g). As amostras foram retiradas da mistura reacional em vários intervalos de tempo (200  $\mu$ L) para cada sistema de reação, diluídas em 10 mL de solução de álcool (95% m/m) e tituladas com solução de NaOH  $30 \times 10^{-3}$  mol/L, utilizando fenolftaleína como indicador para determinar a concentração de ácido graxo residual e determinar assim a porcentagem de conversão (Y), conforme Eq. (16) (ALVES et al., 2017; LAGE et al., 2016; MIRANDA et al., 2014):

$$Y(\%) = \left( \frac{A_0 - A_f}{A_0} \right) \times 100 \quad (16)$$

Em que:  $A_0$  é a concentração inicial de ácido carboxílico ( $\times 10^{-3}$  mol/L) e  $A_f$  é a concentração de ácido carboxílico em determinado tempo de reação ( $\times 10^{-3}$  mol/L).

### 3.8 Otimização da síntese de estearato de cetila por delineamento experimental

A síntese enzimática do estearato de cetila em meio hexano foi otimizada empregando um delineamento completo central rotacional (DCCR) com oito ensaios fatoriais, 6 ensaios axiais e três ensaios no ponto central. Os níveis das variáveis foram escolhidos com base em ensaios preliminares e estudos prévios realizados em nosso laboratório (Alves et al., 2016, 2017; Lage et al., 2016; Machado et al., 2018). Os parâmetros e seus níveis das variáveis estudadas foram: temperatura de reação (40 –

70°C), concentração de biocatalisador (5 – 25% m/v) e agitação (0 – 240 rpm). A conversão em éster após 20 min de incubação foi tomada como variável reposita. Os resultados foram analisados utilizando o software Statistics versão 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

#### 3.8.1 Efeito da razão molar ácido:álcool na síntese de éster

O efeito da razão molar ácido:álcool de 1:1 a 1:1,5 mol/L foi analisado nas condições experimentais ótimas de reação previamente determinadas por DCCR (64°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v de meio reacional e agitação de 170 rpm). Neste conjunto de experimentos, a concentração de ácido esteárico foi fixada em 1 mol/L com o intuito de minimizar a inativação do biocatalisador por acidificação de seu microambiente (Miranda et al., 2014; Alves et al., 2016). As reações foram conduzidas por 20 min de incubação em shaker orbital.

#### 3.8.2 Efeito da concentração de peneira molecular na síntese de éster

O efeito da concentração de peneira molecular (0, 5, 10 e 20% m/m) na síntese do estearato de cetila foi avaliado nas condições experimentais ótimas (64°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v de meio reacional, agitação de 170 rpm e razão equimolar ácido:álcool – 1:1). As peneiras foram previamente ativadas por incubação a 250°C em forno mufla por 24 h. As reações foram conduzidas por 20 min de incubação em shaker orbital.

#### 3.8.3 Efeito do tempo de reação na síntese de éster

O efeito do tempo de reação na síntese do estearato de cetila foi avaliado nas condições experimentais ótimas (64°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v de meio reacional, 170 rpm, razão equimolar ácido:álcool 1:1 e ausência de peneira molecular).

#### 3.8.4 Teste de estabilidade operacional

A estabilidade operacional do biocatalisador preparado neste estudo na síntese de estearato de cetila foi avaliada após nove sucessivos ciclos de reação de 60 min cada. As reações foram realizadas nas condições experimentais ótimas previamente estabelecidas (64°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v de meio reacional, 170 rpm, razão equimolar ácido:álcool 1:1 e ausência de peneira molecular). Após

cada ciclo de reação, o biocatalisador foi filtrado, lavado com hexano gelado para a remoção de materiais de partida não convertidos e produtos adsorvidos em seu microambiente e secado sob vácuo a temperatura ambiente por 2 h. Após este procedimento, o biocatalisador foi recuperado e incubado em um novo meio reacional.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, sílica foi extraída da casca do arroz e funcionalizada com OCTES para a produção de um suporte hidrofóbico para ser aplicado na adsorção física de LTL. O esquema representativo da funcionalização e adsorção física da LTL utilizando o suporte preparado está representado na Figura 5.

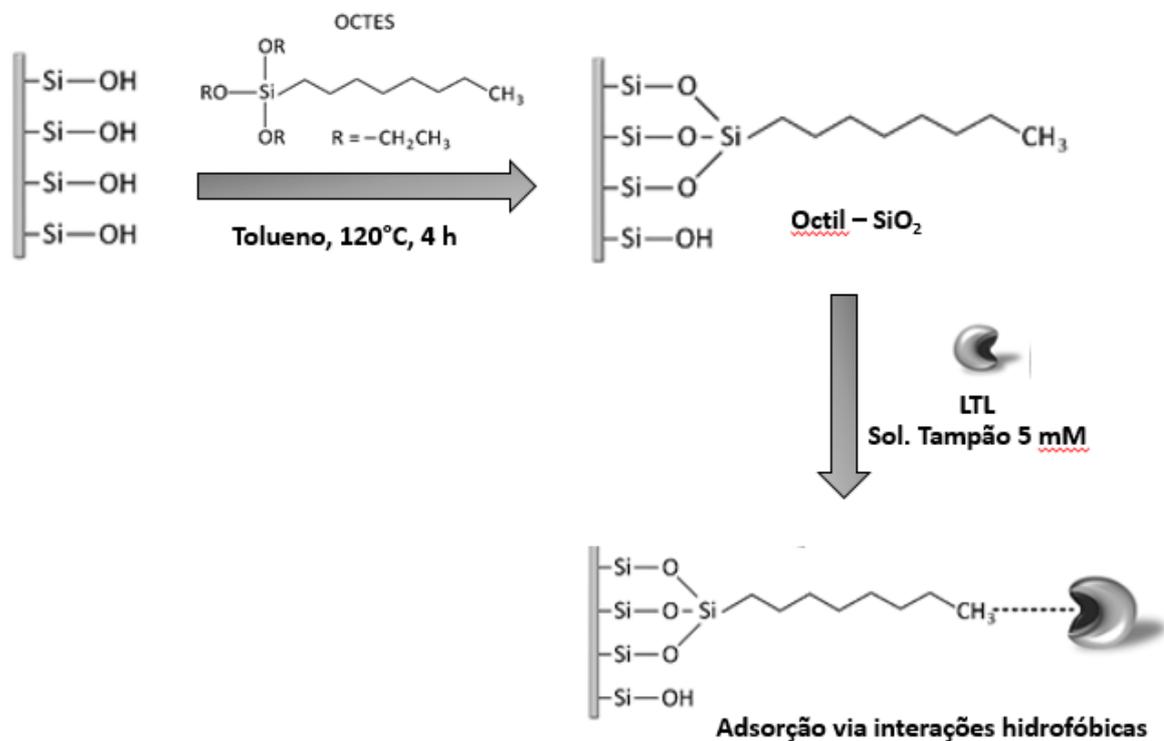


Figura 5 - Esquema representativo da funcionalização da  $\text{SiO}_2$  a partir da casca do arroz com OCTES e a adsorção física da LTL no suporte preparado.

Fonte: Do autor.

A adsorção da lipase em  $\text{Octil-SiO}_2$  procedeu via interação hidrofóbica das regiões hidrofóbicas que circundam o seu sítio ativo com os grupos octil inseridos na superfície do suporte (mecanismo de ativação interfacial das lipases em superfícies hidrofóbicas) após o processo de silanização (LIMA et al., 2015; VESCOVI et al., 2017). Algumas lipases, incluindo LTL, reconhecem estes suportes como sendo similar ao seu substrato natural (gotas de óleo) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; ZHAO et al., 2015). Neste sentido, a enzima está orientada em direção à superfície do suporte.

#### 4.1 Caracterização das partículas de sílica funcionalizada e não funcionalizada

No presente estudo, várias técnicas foram usadas para mostrar o efeito da funcionalização nas propriedades do suporte preparado. O suporte obtido apresentou ampla distribuição de tamanho de partícula na faixa de 78,5-453,1  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de partícula de  $269,1 \pm 24,6 \mu\text{m}$ . Valores semelhantes para partículas de  $\text{SiO}_2$  funcionalizadas (Octil- $\text{SiO}_2$ ) também foram observados, mostrando que o procedimento de silanização não alterou o tamanho das partículas do suporte.

Os dados de difração de raio X obtidos para a sílica não funcionalizada e funcionalizada (Octil- $\text{SiO}_2$ ) estão ilustrados na Figura 6. A sílica obtida mostrou ser um material amorfo com características com picos amplos entre 15 e 30° (CUI et al., 2017). Após a etapa de funcionalização, possíveis mudanças não foram encontradas em sua estrutura amorfa. Similares difratogramas foram reportados em estudos anteriores para partículas de sílica funcionalizadas e não funcionalizadas (CUI et al., 2017; LI et al, 2015; WANG et al., 2012).

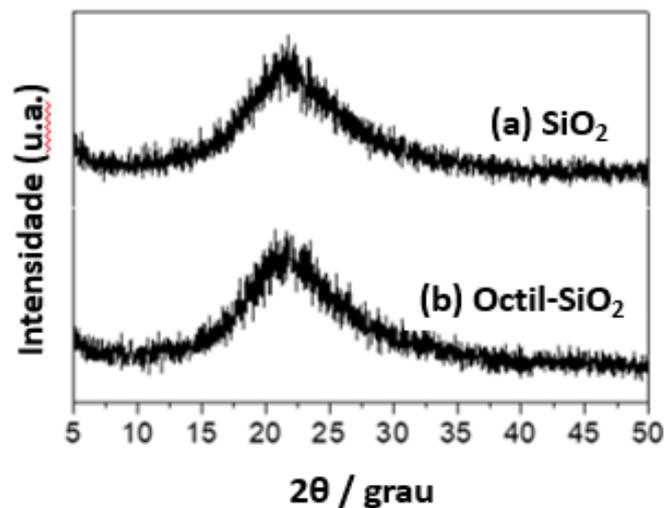


Figura 6 - Análise de DRX para  $\text{SiO}_2$  e Octil- $\text{SiO}_2$ .

Fonte: Do autor.

Análises termogravimétricas foram realizadas para ambos os suportes (partículas funcionalizadas e não funcionalizadas) com intuito de confirmar a introdução das cadeias carbônicas (octil do OCTES) na superfície do suporte. De acordo com a Figura 7, as partículas não funcionalizadas de  $\text{SiO}_2$  exibiram alta estabilidade térmica e uma perda de massa de 3% m/m a 900°C foi observada devido à condensação dos

grupos silanol (-Si-OH) livres para a produção dos grupos siloxano (-Si-O-Si) na superfície do suporte e então liberação de moléculas de água (ASHU-ARRAH et al., 2017). A perda inicial de massa do Octil-SiO<sub>2</sub> de aproximadamente 2% m/m a 250°C pode ser atribuída à perda de moléculas de água adsorvidas no suporte enquanto que no segundo estágio a perda de massa é atribuída à decomposição de grupos octil da superfície do suporte com perda de massa percentual da ordem de 4% m/m a 900°C. Perfis similares de perda de massa foram observados em estudos anteriores com sílica não funcionalizada e funcionalizada com grupos octil utilizando sílica comercial (LIMA et al., 2015).

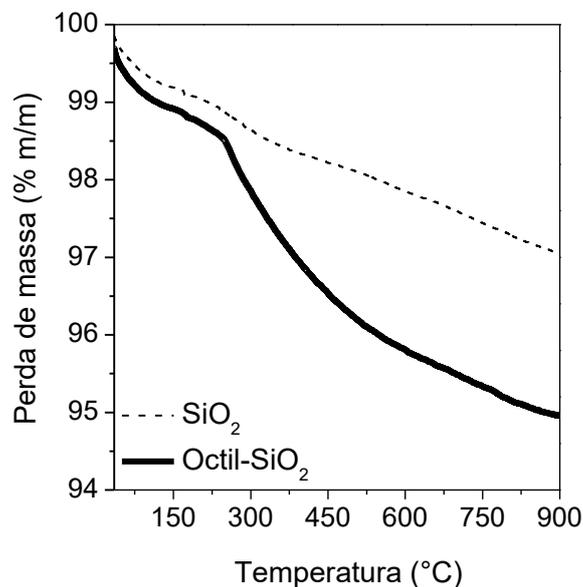


Figura 7 - Análises de ATG da SiO<sub>2</sub> e Octil-SiO<sub>2</sub> em atmosfera de ar sintético.

Fonte: Do autor.

Microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica importante para obtenção topografia superficial (ZDARTA et al., 2017). Imagens de topografia 3D da sílica não funcionalizada e funcionalizada com OCTES usando MFA são mostradas na Figura 8 e os parâmetros de rugosidade média (R<sub>m</sub>) e altura (Z) foram estimados e sumarizados na Tabela 1. De acordo com a Figura 8, a sílica não funcionalizada (Figura 8 – A) mostrou maior altura média (relação entre os valores de pico máximo e pico mínimo) e rugosidade em termos de R<sub>m</sub>. Além disso, a presença de alguns “vales” na sua superfície também foi observada, mostrando que o suporte extraído da casca do arroz tem uma superfície irregular. Entretanto, uma drástica redução da rugosidade e de

altura após a funcionalização com OCTES foi observada. Estes resultados são atribuídos à introdução de novos grupos funcionais na superfície do suporte.

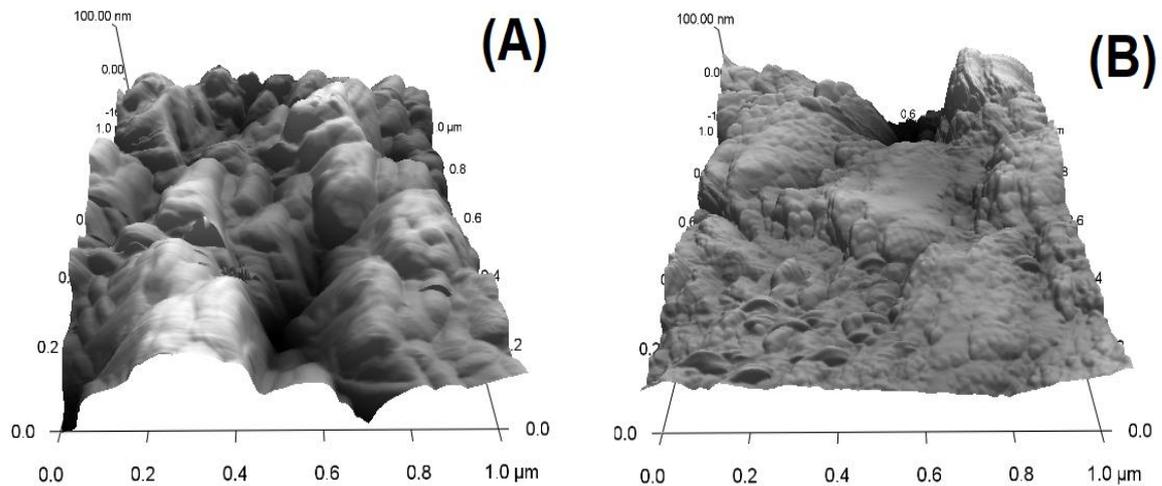


Figura 8 - Imagem 3D de MFA para  $\text{SiO}_2$  (A) e Octil- $\text{SiO}_2$  (B).

Fonte: Do autor.

Análises de MEV também foram realizadas para demonstrar o efeito da funcionalização nas propriedades físicas do suporte preparado (Figura 9). Como pode ser observado, a superfície externa da  $\text{SiO}_2$  é coberta por pequenas cúpulas irregulares bem alinhadas (aumento de 500 x – Figura 9 - A). Imagens similares de MEV para este material foram reportadas em estudos anteriores (KE et al., 2016; WANG et al., 2011). De acordo com as imagens de MEV com aumento de 2000 x (Figuras 9 - B e 9 - C), é possível observar a formação de uma superfície mais homogênea após a etapa de funcionalização com OCTES. Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente reportados para análise de MFA.

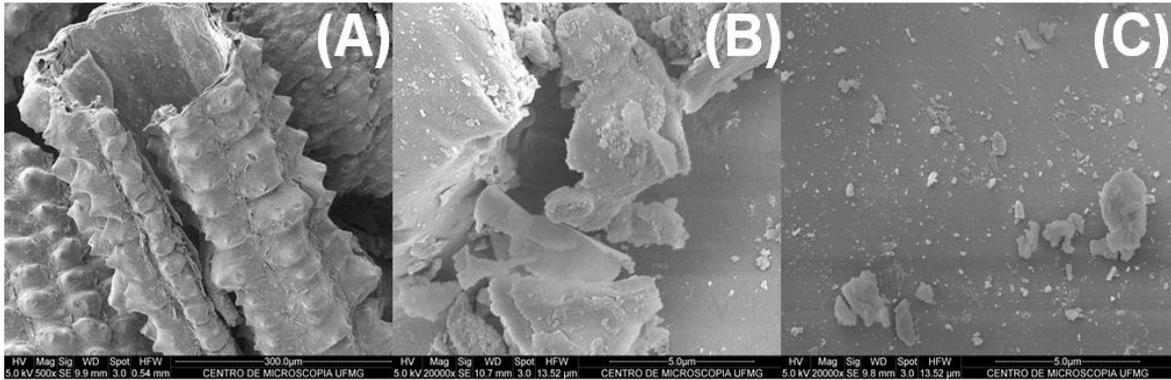


Figura 9 - Imagens de MEV de SiO<sub>2</sub> (aumento de 500 x – A e 2000 x – B) e Octil-SiO<sub>2</sub> (aumento de 2000 x – C).

Fonte: Do autor.

Análise de fisissorção de nitrogênio foi usada para caracterizar a estrutura porosa do suporte não funcionalizado e funcionalizado com OCTES. Os resultados sumarizados na Tabela 1 mostram que a área superficial específica das partículas de sílica não funcionalizada é de 222,1 m<sup>2</sup>/g. Após a etapa de funcionalização, foi observada uma redução da área superficial específica e volume médio dos poros. De acordo com a classificação da IUPAC, diâmetro médio de poros entre 2-50 nm é característico de um material mesoporoso, enquanto que tamanho de poro acima de 50 nm é considerado um material macroporoso. O diâmetro médio dos poros do suporte não funcionalizado e funcionalizado foi de 36 Å, indicando assim as suas naturezas mesoporas. Estes resultados indicam que a funcionalização do suporte tenha sido preferencialmente realizada na superfície externa da SiO<sub>2</sub> e por esta razão não foi observada uma redução do diâmetro médio dos poros. LTL é uma enzima com diâmetro molecular médio de 53,2 Å (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), 1,5 vezes maior que o diâmetro médio do suporte. Consequentemente, preferencial adsorção da LTL na superfície externa do suporte é esperada. Entretanto, algumas moléculas de LTL também podem ter sido adsorvidas na superfície interna do suporte preparado.

Tabela 1 - Caracterização de sílica não funcionalizada (SiO<sub>2</sub>) e funcionalizada com grupos octil (Octil-SiO<sub>2</sub>).

Parâmetros	Suporte	
	SiO <sub>2</sub>	Octil-SiO <sub>2</sub>
Rugosidade média (nm)	25,5	13,3
Altura média (nm)	8,1	7,7
Área superficial específica (m <sup>2</sup> /g)	222,1	196,0
Volume específico de poro (cm <sup>3</sup> /g)	0,38	0,35
Diâmetro de poro médio (Å)	36,4	36,2
Adsorção de RB (µg/m <sup>2</sup> )	11,6 ± 1,8	36,5 ± 2,6

Fonte: Do autor.

A hidrofobicidade de um suporte é uma importante característica a ser utilizada na imobilização de lipases (ASHU-ARRAH et al., 2017; LIMA et al, 2017; ZOU et al., 2014;). Neste trabalho, a caracterização da hidrofobicidade de SiO<sub>2</sub> não funcionalizada e funcionalizada com OCTES foi realizada empregando o método clássico de adsorção do corante Rosa de Bengala (RB) (VESCOVI et al., 2016, 2017). Os resultados foram expressos em quantidade de massa de corante adsorvida por unidade de área superficial específica (Tabela 1). Como esperado, a funcionalização com OCTES aumentou a capacidade do suporte de adsorção do corante RB de 11,6 ± 1,8 para 36,5 ± 2,6 µg/m<sup>2</sup>. Estes resultados confirmam o aumento da hidrofobicidade do suporte funcionalizado preparado. Este é um importante requisito para a preparação de suportes para a imobilização de lipases via mecanismo de ativação interfacial e de biocatalisadores altamente ativos devido à boa partição de substratos hidrofóbicos do meio de reação aos microambientes externo/interno do biocatalisador preparado, como gotas de óleo (reação de hidrólise) e ácidos graxos e álcoois graxos (substratos para reações de esterificação).

#### 4.2 Efeito da funcionalização de SiO<sub>2</sub> na imobilização de LTL

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, é possível observar que a funcionalização com OCTES permitiu a criação de um microambiente mais favorável para a adsorção da LTL devido à maior adsorção da enzima na superfície do suporte.

Além disso, o biocatalisador preparado exibiu também maior atividade hidrolítica devido à melhor acessibilidade das gotas de óleo da mistura reacional para a superfície do biocatalisador, como reportado no item 4.1 descrito acima, na qual pode ser confirmada com os valores de atividade hidrolítica e específica. Além disso, o processo de adsorção foi mais espontâneo utilizando o suporte Octil-SiO<sub>2</sub> ( $\Delta G^\circ = -20,4$  kJ/mol) devido à forte afinidade da LTL para superfícies hidrofóbicas. Estes resultados confirmam a ativação interfacial da lipase na superfície do Octil-SiO<sub>2</sub> e sua aplicação promissora na preparação de biocatalisadores imobilizados com alta concentração de proteína imobilizada e atividade catalítica. Consequentemente, estudos subsequentes foram realizados empregando o suporte funcionalizado.

Tabela 2 - Parâmetros de adsorção de LTL imobilizada em partículas de sílica não funcionalizada (SiO<sub>2</sub>) e funcionalizada com grupo octil (Octil-SiO<sub>2</sub>). A imobilização foi realizada em pH 5,0 (tampão acetato de sódio  $5 \times 10^{-3}$  mol/L empregando carregamento inicial de proteína de 5 mg/g de suporte).

Suporte	q <sub>e</sub> (mg/g)	C <sub>e</sub> (mg/g)	AH (UI/g)	AE (UI/mg <sub>IP</sub> )	K <sub>e</sub>	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)
SiO <sub>2</sub>	3,2 ± 0,2	9,5×10 <sup>-2</sup>	79,7 ± 5,5	25,0 ± 2,7	33,7	-8,7
Octil-SiO <sub>2</sub>	≈5,0	1,3×10 <sup>-3</sup>	192,7 ± 5,5	38,1 ± 2,4	3826,9	-20,4

Fonte: Do autor.

#### 4.3 Efeito do pH na imobilização de LTL

O efeito do pH de incubação no processo de adsorção foi avaliado no intervalo de 4,0 a 9,0. Na Tabela 3, estão sumarizados os resultados dos parâmetros de imobilização de LTL determinados neste intervalo de pH. Como pode ser observado, o pH de incubação não influenciou na concentração de proteína imobilizada. Estes resultados mostram que a adsorção da LTL neste suporte foi controlada por interações hidrofóbicas (ALVES et al., 2017). Com relação à atividade hidrolítica, o biocatalisador preparado em pH 5,0 foi o mais ativo na hidrólise da emulsão o óleo de oliva (AH =  $192,5 \pm 7,8$  UI/g). Com base nos resultados obtidos, a adsorção de LTL em Octil-SiO<sub>2</sub>

em pH 5,0 foi escolhida pois nesta condição foi possível observar máxima atividade catalítica e concentração de proteína imobilizada.

Tabela 3 - Influência do pH nos parâmetros de imobilização de LTL via adsorção em Octil-SiO<sub>2</sub>.

pH	q <sub>e</sub> (mg/g)	C <sub>e</sub> (mg/g)	AH (UI/g)	AE (UI/mgPI)	K <sub>e</sub>	ΔG° (kJ/mol)
4,0	4,8 ± 0,1	1,1×10 <sup>-2</sup>	162,0 ± 8,8	33,9 ± 1,8	436,4	-15,1
5,0	≈5,0	1,3×10 <sup>-3</sup>	192,5 ± 7,8	38,5 ± 1,6	3826,9	-20,4
6,0	≈5,0	1,3×10 <sup>-3</sup>	148,0 ± 5,7	29,6 ± 1,1	3826,9	-20,4
7,0	≈5,0	1,4×10 <sup>-3</sup>	128,8 ± 4,6	25,8 ± 0,9	3571,4	-20,3
8,0	4,9 ± 0,1	6,7×10 <sup>-3</sup>	115,5 ± 11,9	23,4 ± 4,4	731,3	-16,3
9,0	4,5 ± 0,2	2,3×10 <sup>-2</sup>	110,4 ± 3,7	24,3 ± 0,8	195,7	-13,1

Fonte: Do autor.

#### 4.4 Efeito da temperatura na imobilização de LTL

O efeito da temperatura de incubação no processo de adsorção e nas propriedades catalíticas do biocatalisador foi estudado variando de 5 a 25°C, com incremento de 5°C. Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio pH 5,0 em baixa força iônica (5 x 10<sup>-3</sup> mol/L). Nestas condições experimentais, não foram observados efeitos relevantes da temperatura nos parâmetros de imobilização. Estes resultados mostram uma intensa afinidade da enzima com o suporte e por esta razão não foi observada influência da temperatura no processo de adsorção. A lipase foi quase totalmente adsorvida no suporte (≈ 5mg proteína/ g suporte) e os valores de atividade hidrolítica foram similares aos obtidos em pH 5,0 sumarizados na Tabela 4.3 (da ordem de 190 UI/ g de suporte). Baseado nestes resultados, subsequentes testes foram conduzidos a 25°C.

#### 4.5 Efeito do carregamento inicial de proteína na imobilização de LTL: Estudos de isotermas de adsorção

O efeito do carregamento inicial de proteína variando de 5 a 40 mg/g do suporte sobre os parâmetros de imobilização foi estudado com o intuito de determinar a capacidade máxima de adsorção de LTL no suporte funcionalizado. O procedimento de adsorção foi realizado nas condições experimentais previamente estabelecidas (tampão acetato de sódio pH 5,0 (5 x 10<sup>-3</sup> mol/L), 25°C e 15 h de incubação). De

acordo com os dados sumarizados na Tabela 4.4, foi possível observar um aumento na concentração da proteína imobilizada com o aumento do carregamento inicial de proteína de 5 até 30 mg/g. Por outro lado, carregamentos superiores de proteína acima de 30 mg/g não aumentaram a retenção de LTL devido à saturação do suporte (ALVES et al., 2017; LAGE et al., 2016; MIRANDA et al., 2014). Isto sugere que a superfície do suporte tem um número limitado de sítios de adsorção em sua superfície capazes de interagir com a enzima. A capacidade máxima de adsorção do suporte preparado (Octil-SiO<sub>2</sub>) foi de 21,9 ± 0,1 mg/g de suporte. Esta satisfatória capacidade de adsorção deste suporte se deve à sua elevada área superficial hidrofóbica, como mostrado acima – Tabela 1, na qual permite reter alta concentração de proteína imobilizada em sua superfície.

O efeito do carregamento inicial de proteína nas atividades hidrolítica (AH) e específica (AE) dos biocatalisadores preparados é mostrado também na Tabela 4. Como pode ser visto, o aumento do carregamento inicial de proteína de 5 mg/g a 35 mg/g aumentou a atividade hidrolítica dos biocatalisadores preparados de 192,7 ± 5,5 a 630,3 ± 5,8 IU/g, respectivamente, como esperado. Por outro lado, os valores de atividade específica diminuíram com o aumento do carregamento inicial de proteína. Estes resultados poderiam ser atribuídos à saturação do suporte, limitando o acesso dos materiais de partição ao microambiente do biocatalisador.

Tabela 4 - Influência da concentração inicial de proteína nos parâmetros de imobilização de LTL via adsorção física em Octil-SiO<sub>2</sub>.

Carrega- mento de proteína (mg/g)	q <sub>e</sub> (mg/g)	C <sub>e</sub> (mg/g)	AH (UI/g)	AE (UI/mg <sub>PI</sub> )	K <sub>e</sub>	ΔG° (kJ/mol)
5	≈5,0	1,3×10 <sup>-3</sup>	192,7 ± 5,5	38,1 ± 2,4	3826,9	-20,4
10	9,9 ± 0,1	5,3×10 <sup>-3</sup>	429,9 ± 15,2	43,2 ± 3,1	1867,9	-18,7
15	14,8 ± 0,1	1,1×10 <sup>-2</sup>	511,0 ± 13,3	34,3 ± 1,3	1345,5	-17,8
20	19,7 ± 0,3	1,6×10 <sup>-2</sup>	554,8 ± 1,0	28,2 ± 2,1	1231,3	-17,6
25	20,4 ± 0,1	2,4×10 <sup>-1</sup>	557,2 ± 4,3	27,3 ± 0,9	86,3	-11,1
30	21,9 ± 0,1	4,3×10 <sup>-1</sup>	561,4 ± 6,9	25,6 ± 2,4	50,9	-9,7
35	21,7 ± 0,5	7,0×10 <sup>-1</sup>	630,3 ± 5,8	29,0 ± 1,7	31,1	-8,5
40	21,3 ± 0,4	9,8×10 <sup>-1</sup>	618,9 ± 4,9	26,5 ± 0,8	21,7	-7,6

Fonte: Do autor.

A espontaneidade do processo de adsorção pode ser explicada pela determinação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ). De acordo com a Tabela 4, os valores de  $K_e$  para adsorção da LTL em Octil-SiO<sub>2</sub> variou de 3826,9 a 21,5 usando o menor carregamento inicial de proteína de 5 mg/g e o maior de 40 mg/g, respectivamente. Entretanto, a diminuição nos valores de  $K_e$  com o aumento do carregamento inicial de proteína foi observado devido à drástica redução da área superficial disponível no suporte para a adsorção da enzima (saturação do suporte). Os valores de  $K_e$  foram utilizados para determinar os valores de  $\Delta G$  que variaram de  $-20,4$  a  $-7,6$  kJ/mol. Estes valores mostram que a preparação destes biocatalisadores via adsorção da LTL no suporte foi um processo espontâneo. De acordo com a literatura especializada, valores aparentes de  $\Delta G$  variando de 0 a  $-20$  kJ/mol correspondem a um processo de fisissorção, enquanto que um processo de quimissorção estes valores variam de  $-80$  a  $-400$  kJ/mol (Tu et al., 2009). Consequentemente, é possível notar que o processo de imobilização da enzima procedeu via interações físicas (processo de fisissorção).

Isotermas de adsorção têm sido aplicadas aos processos de imobilização de lipases para demonstrar a relação entre a concentração da enzima imobilizada no suporte e a concentração residual na fase líquida no equilíbrio em determinada temperatura (ALVES et al., 2017; LAGE et al., 2016;). Neste estudo, os dados experimentais obtidos foram ajustados aos modelos não lineares de isoterma de adsorção de Langmuir, Freundlich, Temkin, Sips e Redlich-Peterson para descrever o processo de adsorção da LTL em Octil-SiO<sub>2</sub> (Figura 10).

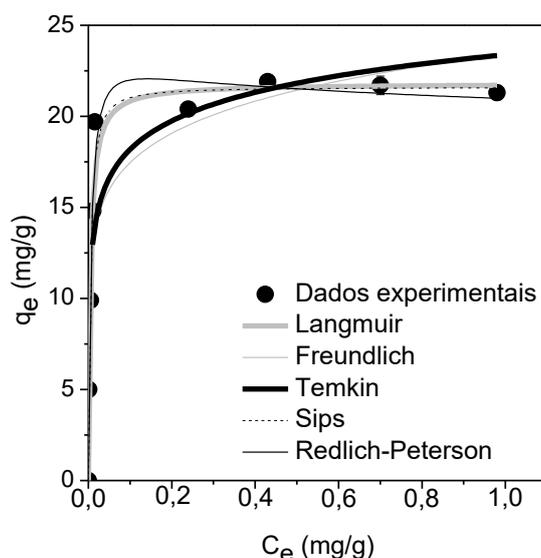


Figura 10. Modelos não lineares de isotermas de adsorção de LTL imobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub> a 25°C.

Fonte: Do autor.

Os valores dos parâmetros isotérmicos, capacidade máxima de adsorção, coeficientes de correlação ( $R^2$ ) e a média dos erros relativos (MER) são mostrados na Tabela 5. Com base nos resultados obtidos, é possível observar que o modelo de Langmuir foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais de adsorção de LTL em Octil-SiO<sub>2</sub>, considerando o maior coeficiente de correlação e o menor valor de MER. Além disso, os valores obtidos para capacidade máxima de adsorção teórica para Octil-SiO<sub>2</sub> ( $q_{\max} = 21,8$  mg/g) foi muito próximo do dado experimental de 21,9 mg/g, como mostrado na Tabela 4. A isoterma de Langmuir é o modelo mais utilizado na adsorção de lipases em diferentes suportes (ALVES et al., 2017). Este modelo assume que a adsorção de moléculas de adsorvato na superfície adsorvente ocorra na forma de monocamadas e que este adsorvente possui um número finito de sítios de adsorção. Além disso, a adsorção de cada molécula adsorvente na superfície adsorvente possui a mesma energia (FOO et al., 2010). A análise de MFA está de acordo com o modelo de Langmuir, pois segundo com a Figura 8 é possível obter a mesma conclusão a respeito da superfície do suporte.

Tabela 5 - Determinação de parâmetros de isoterma para a adsorção de LTL em Octil-SiO<sub>2</sub>.

Isoterma	Equação	Parâmetros	(continua)
			Valores
Langmuir		$q_{\max}$ (mg/g)	21,8
		$K_L$ (mL/mg)	0,005
		$SS_{\text{res}}$	0,123
		$SS_{\text{tot}}$	25,63
		$R^2$	0,9952
		MER	7,24
Freundlich		$q_e$ (mg/g) <sup>a</sup>	20,9
		$K_F$ (mg/g)	23,4
		N	0,13
		$SS_{\text{res}}$	0,868
		$SS_{\text{tot}}$	25,63
		$R^2$	0,9661
	MER	25,7	

Tabela 5 - Determinação de parâmetros de isoterma para a adsorção de LTL em Octil-SiO<sub>2</sub>.

		<b>(conclusão)</b>	
<b>Isoterma</b>	<b>Equação</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
		$q_e$ (mg/g) <sup>a</sup>	21,5
		$A_T$ (mL/mg)	31158,0
		$b_T$ (J/mol)	1096,8
		$SS_{res}$	0,179
		$SS_{tot}$	23,63
		$R^2$	0,993
		MER	20,5
		$A_T$ (mL/mg)	11889,4
		$b_T$ (J/mol)	1,18
		$SS_{res}$	550,3
		$SS_{tot}$	0,16
		$R^2$	25,63
		MER	0,9937
		MER	9,01
Redlich- Peterson		$q_e$ (mg/g) <sup>a</sup>	21,5
		$K_R$ (mL/mg)	1836,5
		$a_R$ (1/mg)	82,3
		G	1,036
		$SS_{res}$	0,156
		$SS_{tot}$	25,63
		$R^2$	0,9939
		MER	7,88

a: valor de  $q_e$  determinado para concentração inicial de enzima de 30 mg/g de suporte ( $C_e = 0,43$  mg/mL).

Fonte: Do autor.

#### 4.6 Efeito do tempo de contato na imobilização de LTL

O efeito do tempo de contato na concentração da proteína imobilizada no suporte funcionalizado é mostrado na Figura 11. A concentração de proteína imobilizada na superfície do suporte aumentou com o aumento do tempo de incubação, como esperado, e o equilíbrio foi alcançado no tempo de 150 min de incubação.

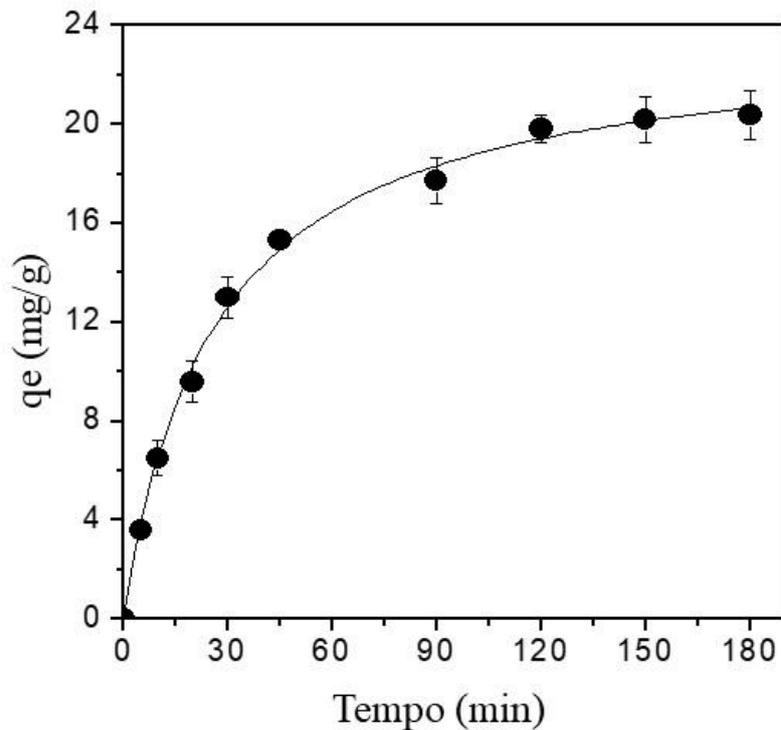


Figura 11 - Efeito do tempo de incubação na adsorção de LTL em Octil-SiO<sub>2</sub> empregando carregamento inicial de proteína de 30 mg/g de suporte.

Fonte: DO AUTOR.

#### 4.7 Síntese de biolubrificantes por esterificação (ésteres de cetila)

Foi investigada também a habilidade do biocatalisador preparado em catalisar reações de esterificação. Neste trabalho, octanoato de cetila, estearato de cetila e oleato de cetila foram sintetizados em meio hexano com o intuito de reduzir a viscosidade da mistura reacional e melhorar a acessibilidade dos reagentes ao microambiente do biocatalisador (KUO et al., 2012). Ésteres de cetila são importantes compostos do ponto de vista industrial porque são amplamente empregados em formulações de lubrificantes, plastificantes e em materiais de revestimento (Serrano-Arnaldos et al., 2016).

De acordo com a Figura 12, máxima conversão da ordem de  $94,0 \pm 1,0\%$  para os três diferentes ésteres pode ser observada, entretanto o tempo mínimo requerido para atingir esta porcentagem de conversão para octanoato de cetila, estearato de

cetila e oleato de cetila foi 135, 110 e 310 min, respectivamente. Estes resultados mostram que o biocatalisador preparado exibiu maior afinidade para aqueles meios reacionais contendo ácidos graxos saturados (octanoico e esteárico). Uma possível explicação para esta afinidade é que estes ácidos graxos apresentam estrutura linear, não ocorrendo impedimento estérico, facilitando o acesso do biocatalisador, acelerando a reação de esterificação.

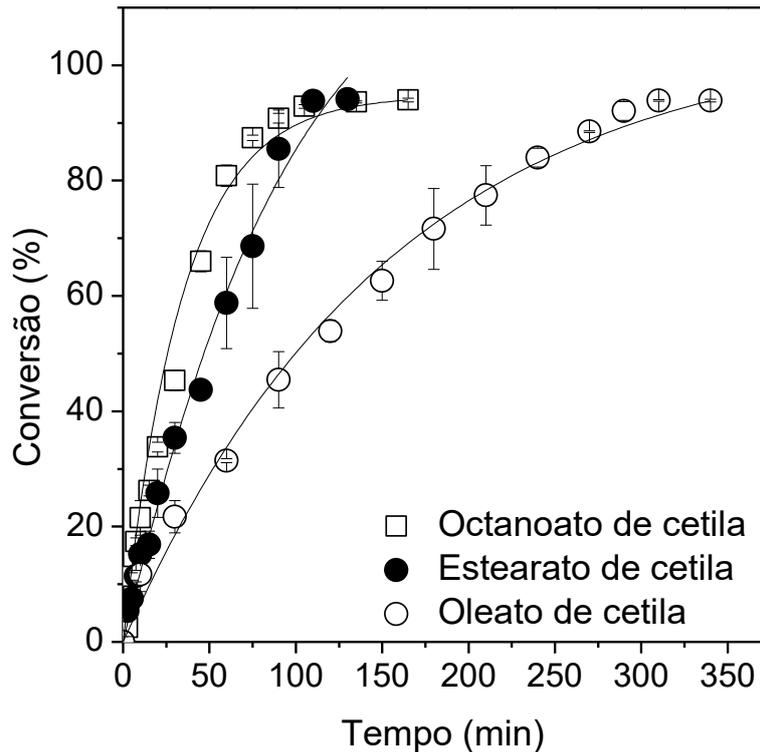


Figura 12 - Efeito do tempo de reação na síntese de ésteres cetila por reação de esterificação em meio hexano catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub>.  
Fonte: Do autor.

Além disso, o biocatalisador preparado necessitou de um menor tempo de reação comparado àqueles descritos em estudos anteriores reportados pela literatura especializada, os quais relatam a síntese de ésteres de cera em sistemas com solventes, assim como os ésteres de cera à base de óleo de palma catalisados pela lipase *Mucor miehei* comercialmente imobilizada – Lipozyme IM (conversão de 84,5% em 7,38 h de reação) Basri et al (2007); vinte diferentes ésteres de cera produzidos por reação de esterificação catalisada por lipase *Candida rugosa* quimicamente modificada com polietilenoglicol e imobilizada em polipropileno (conversão completa após 10 h de reação) Guncheva e Zhiryakova (2008); síntese de estearato catalisada pela lipase de

*Bacillus stearothermophilus* MC7 imobilizada via adsorção em partículas de  $\text{NanoSnO}_2$  (conversão de 86,2% para 5 h de reação) Guncheva et al (2013); e síntese de ésteres cetílicos de gordura bruta de peixe sintetizados pela lipase crua extraída da *Burkholderia sp.* EQ3 (95,07% de conversão em 5 h de reação) Ungcharoenwiwat et al (2013). De acordo com os resultados obtidos pode se constatar que este biocatalisador mostrou ser altamente promissor na síntese de ésteres de cetila, especialmente estearato de cetila. Este sistema reacional foi selecionado para subsequentes testes com o intuito de otimizar a sua produção, visto que o ácido esteárico é um produto de origem animal e consiste na mistura dos ácidos graxos sólidos de matérias graxas. A concentração de ácido esteárico nestes compostos chega a ser maior que 40%. O ácido esteárico é amplamente utilizado em escala industrial, sendo o mais utilizado na área cosmética como espessante e emulsificante para a elaboração de cremes, borracha, estearatos, cosméticos, emulsões, lubrificantes e produtos têxteis. Na indústria farmacêutica é utilizado como lubrificante de cápsulas. (HANDBOOK OF FARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2000; MANERA, 2009).

#### 4.8 Otimização da síntese de éster por DCCR

Neste estudo, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para otimizar a síntese enzimática de esterato de cetila em meio hexano. Para tal finalidade, foi analisado o efeito de concentração de biocatalisador (5 - 25%), temperatura de reação (40 – 70°C) e agitação (0 – 240 rpm) na reação. O uso desta técnica é vantajoso em relação aos métodos convencionais de análise de variáveis porque inclui menor número de experimentos, adequação a múltiplos fatores experimentais e fácil busca pela relação entre vários fatores, resultando na identificação das condições ótimas do processo (HANRAHAN et al., 2006).

De acordo com a Tabela 6, a porcentagem de conversão variou de  $3,2 \pm 0,2\%$  (ensaio #11) a  $70,1 \pm 0,3\%$  (ensaio #8). Estes resultados mostram que o aumento da concentração de biocatalisador no meio de reação aumentou a formação do éster, mostrando que a síntese de estearato de cetila foi cineticamente controlada. Comparando o ensaio #6 com o ensaio #8, conduzidos com os mesmos valores de temperatura e agitação, foi possível observar um aumento da porcentagem de conversão de

21,5 ± 1,5% para 70% com o aumento da concentração de biocatalisador de 9% m/v para 21% m/v de meio de reação. Entretanto, no ensaio conduzido com máxima quantidade de biocatalisador utilizado no planejamento (25% m/v – ensaio #12), a conversão obtida (29,5 ± 0,1 %) foi inferior àquela obtida para concentração de biocatalisador de 21% m/v (ensaio #4) – 38,4 ± 0,3%. Isto é devido ao aumento da viscosidade do meio com o aumento de biocatalisador que reduziu a acessibilidade dos reagentes aos sítios ativos da enzima imobilizada.

Na Tabela 6 é possível verificar que o segunda maior de porcentagem de conversão, da ordem de 50% após 20 min de reação, foi obtido no ensaio #7 (46°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v e 170 rpm). Comparando este resultado com aquele obtido no ensaio #8, nota-se que o aumento de temperatura de 46°C para 64°C elevou a conversão de 50% para 70%. Este aumento de conversão em éster com a elevação de temperatura é atribuído à redução da viscosidade do meio que, conseqüentemente, aumentou a frequência de colisões entre os materiais de partida e a superfície biocatalisador heterogêneo (ALVES et al., 2016; LAGE et al., 2016).

Tabela 6 - Matriz do DCCR utilizado para investigar o efeito das variáveis independentes na síntese enzimática de estearato de cetila. Os ensaios foram realizados por 20 minutos de incubação.

(continua)

Ensaio	Variáveis independentes			Conversão (%)
	Temperatura (°C)	Biocatalisador (% m/v)	Agitação (rpm)	
1	-1 (46)	-1 (9)	-1 (70)	20,4 ± 0,8
2	+1 (64)	-1 (9)	-1 (70)	16,5 ± 1,6
3	-1 (46)	+1 (21)	-1 (70)	34,4 ± 0
4	+1 (64)	+1 (21)	-1 (70)	38,4 ± 0,3
5	-1 (46)	-1 (9)	+1 (170)	22,7 ± 0,2
6	+1 (64)	-1 (9)	+1 (170)	21,5 ± 1,5
7	-1 (46)	+1 (21)	+1 (170)	50,4 ± 0,6
8	+1 (64)	+1 (21)	+1 (170)	70,1 ± 0,3
9	-1.68 (40)	0 (15)	0 (120)	24,2 ± 0

Tabela 6 - Matriz do DCCR utilizado para investigar o efeito das variáveis independentes na síntese enzimática de estearato de cetila. Os ensaios foram realizados por 20 minutos de incubação.

Ensaio	Variáveis independentes			(conclusão)
	Temperatura (°C)	Biocatalisador (% m/v)	Agitação (rpm)	Conversão (%)
10	+1,68 (70)	0 (15)	0 (120)	29,2 ± 0,1
11	0 (55)	-1.68 (5)	0 (120)	3,2 ± 0,2
12	0 (55)	+1.68 (25)	0 (120)	29,5 ± 0,3
13	0 (55)	0 (15)	-1.68 (0)	25,0 ± 2,1
14	0 (55)	0 (15)	+1.68 (240)	20,7 ± 1,8
15	0 (55)	0 (15)	0 (120)	21,2 ± 2,5
16	0 (55)	0 (15)	0 (120)	22,9 ± 0,5
17	0 (55)	0 (15)	0 (120)	20,85 ± 3,7

Fonte: Do autor.

De acordo com os resultados obtidos para os níveis mínimo (reação em modo estático – ensaio #13) e máximo (240 rpm – ensaio #14) de agitação, similar conversão em éster foi observado – entre 25,0 ± 2,1% e 20,7 ± 1,8% após 20 min de incubação. Estes resultados foram obtidos empregando concentração de biocatalisador de 15% m/v. Para reações com alta concentração de biocatalisador (21% m/v), o aumento da frequência de agitação de 70 rpm para 170 rpm dobrou a conversão em éster – de 38,4 ± 0,3% (ensaio #4) para 70,1 ± 0,3% (ensaio #8). Estes resultados são devido à redução da espessura da camada-limite estagnada ao redor do microambiente do biocatalisador que poderia minimizar a influência da difusão externa na velocidade cinética da reação.

De acordo com a análise de variância (Tabela 7), o modelo gerado não foi apropriado para a geração das superfícies de resposta ( $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ ), porém isso não invalida a análise estatística e tampouco a análise dos dados experimentais obtidos.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA).

Fonte de variação	Soma dos Quadros	Grau de liberdade	Quadrado médio	F-teste	p-valor
<b>Regressão</b>	2647,55	9	249,17	2,4	0,13023
<b>Residual</b>	856,50	7	122,36		
<b>Falta de ajuste</b>	854,10				
<b>Erro puro</b>	2,41				
<b>Total</b>	3504,05	16			

---

**R<sup>2</sup>=0,76; F<sub>0,5;9,7</sub>=3,39**

Fonte: Do autor.

Mesmo sem a construção de uma superfície de resposta, foi possível encontrar uma condição experimental capaz de obter máxima conversão em éster – frequência de agitação de 170 rpm, 64°C e concentração de biocatalisador de 21% m/v (condições obtidas no ensaio #8). Estas condições experimentais foram obtidas nos níveis +1 das variáveis avaliadas, mostrando que não foi necessária máxima concentração de biocatalisador, temperatura e agitação para obter elevada produção de estearato de cetila. Isto mostra claramente a importância do emprego do delineamento experimental proposto para a otimização desta reação, justificando a sua utilização, mesmo não sendo possível obter-se um modelo de superfície de resposta, como reportado acima. Conseqüentemente, subsequentes testes foram realizados nas condições reacionais obtidas no ensaio #8.

#### 4.8.1 Efeito da razão molar ácido:álcool na síntese de éster

A razão molar ácido:álcool é um fator importante na síntese de vários ésteres, incluindo os ésteres de cera (BI et al., 2016; KUO et al., 2013; LI et al., 2011). A síntese enzimática de ésteres é um processo reversível e o aumento da concentração dos reagentes (ácido esteárico ou álcool cetílico) pode afetar o equilíbrio da reação na

direção da formação do éster (BASSI et al., 2016), ou resultar na redução da velocidade inicial da reação e, conseqüentemente, sua conversão, possivelmente devido à inibição do biocatalisador (BASSI et al., 2016; BADJUGAR et al., 2014 e BADJUGAR et al., 2015).

O efeito da razão molar ácido:álcool foi avaliado no intervalo de 1:1 a 1:1,5. Nestes ensaios, a concentração de ácido foi mantida fixa (1 mol/L) com o intuito de minimizar a acidificação do microambiente do biocatalisador. Estudos anteriores realizados em nosso grupo mostraram um drástico decréscimo da atividade catalítica de biocatalisadores preparados por adsorção de LTL em partículas hidrofóbicas de poli-hidróxi-butilato (PHB) e poli-(estireno-divinilbenzeno) (PSty-DVB) com o aumento da concentração de ácidos carboxílicos no meio de reação (ALVES et al., 2016; MIRANDA et al., 2014). A síntese do éster foi realizada por um período de 20 min de incubação nas condições previamente selecionadas pelo DCCR (64°C, 21% m/v de biocatalisador e 170 rpm). Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 13.

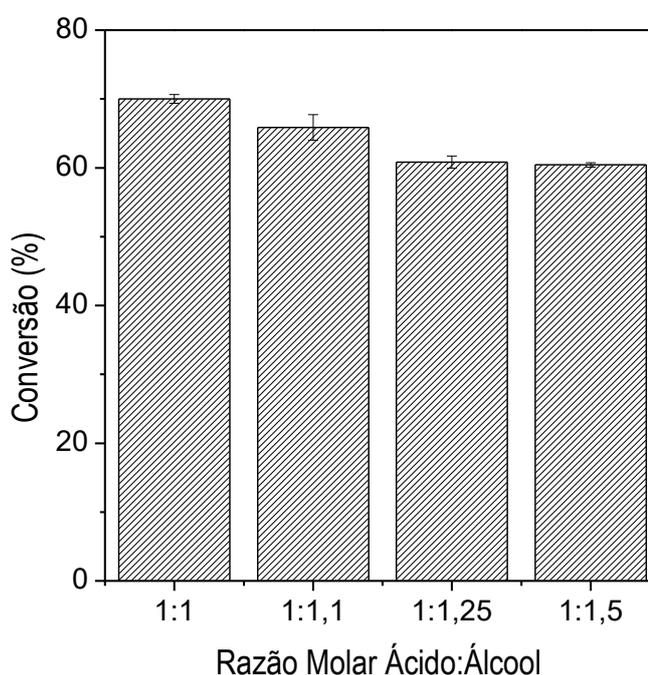


Figura 13 - Efeito do excesso de álcool cetílico na esterificação do estearato de cetila, nas condições ótimas de reação, catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub>.

Fonte: Do autor.

Com o aumento da concentração do álcool foi observado um decréscimo na conversão do estearato de cetila, possivelmente devido ao aumento da viscosidade

do meio reacional, acarretando em maiores problemas difusionais em comparação ao teste realizado na razão molar de ácido:álcool 1:1. Outra explicação para este decréscimo na produção do éster é que o excesso de álcool cetílico no meio de reação aumentou sua adsorção na superfície do biocatalisador que aumentou a interação hidrofílica entre moléculas de água geradas e moléculas de lipase imobilizadas. Conseqüentemente, o equilíbrio a reação foi deslocado para o sentido inverso (reação de hidrólise) (LIMA et al., 2018; YANG et al., 2004). De acordo com estes resultados, a síntese do éster realizada na relação equimolar ácido: álcool (1:1) foi escolhido para sucessivos ensaios.

#### 4.8.2 Efeito da concentração de peneira molecular na síntese de éster

Nas reações de esterificação, a água formada como subproduto representa um fator limitante, favorecendo a reação reversa (hidrólise do éster). É comum adotar procedimentos para remoção deste subproduto por técnicas que sejam adequadas (LAGE et al., 2016; MIRANDA et al., 2014;), incluindo o uso de agentes desidratantes como peneiras moleculares, conforme foi realizado neste trabalho. Foram realizados testes com adição de 0, 5, 10 e 20% m/v de peneira molecular ao meio reacional com o intuito de remover moléculas de água formadas durante a reação e deslocar o equilíbrio para a formação do éster lubrificante (estearato de cetila). Com base nos resultados obtidos (Figura 4.10), foi observado um decréscimo na produção do éster, seguido de uma tendência de estabilização no rendimento da reação. Este efeito negativo poderia ser creditado à remoção da camada de hidratação da enzima ou aumento da viscosidade no meio de reação que, conseqüentemente, reduziu a difusão externa dos materiais de partida ao microambiente do biocatalisador heterogêneo preparado (LIMA et al., 2018; FERRER et al., 2005). Neste sentido, testes posteriores foram realizados na ausência de peneira molecular.

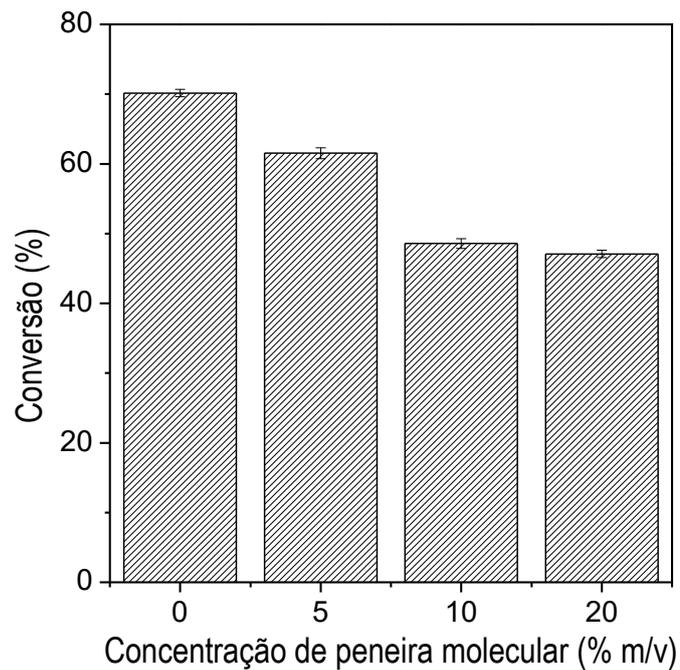


Figura 14 - Efeito da adição de peneira molecular na esterificação do estearato de cetila, nas condições ótimas de reação, catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub>.

Fonte: Do autor.

#### 4.8.3 Efeito do tempo de reação na síntese de éster

A reação de esterificação foi conduzida nas condições ótimas estabelecidas (64°C, 21% m/v de biocatalisador e 170 rpm) por um período máximo de 90 min de incubação com o intuito de verificar o tempo mínimo de reação necessário para atingir a máxima conversão. Como pode ser observado na Figura 15, após 30 min de reação a conversão foi de aproximadamente 80% e em 60 min atingiu a máxima conversão da ordem de 90%. Nestas condições ótimas de reação, o tempo de reação para conversão máxima do éster foi reduzido praticamente pela metade se comparado com o primeiro ensaio realizado (Figura 12), na qual requereu 110 min de reação para alcançar similar conversão.

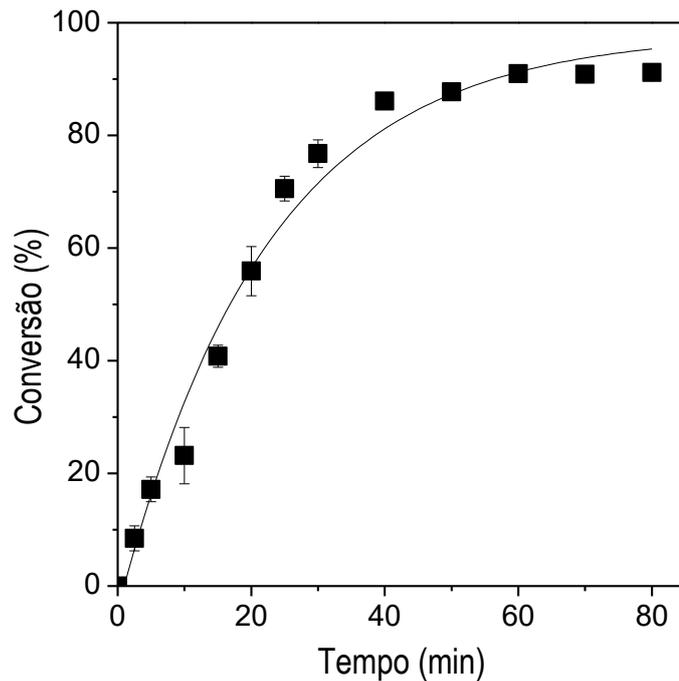


Figura 15 - Efeito do tempo de reação na esterificação estearato de cetila em meio hexano catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub>, nas condições ótimas de reação.

Fonte: Do autor.

#### 4.8.4 Teste de estabilidade operacional

A reusabilidade de enzimas imobilizadas é muito importante para suas aplicações, principalmente em escala industrial (Alves et al., 2016; Lima et al., 2018). Neste conjunto de ensaios, LTL imobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub> foi utilizada para catalisar a síntese do estearato de cetila nas condições ótimas de reação previamente estabelecidas de 64°C, 21% m/v de biocatalisador, 170 rpm e razão molar ácido:álcool 1:1 em meio hexano, após 9 sucessivos ciclos de 60 min cada. Os dados de conversão obtidos em cada ciclo de reação em modo batelada estão ilustrados na Figura 16.

O biocatalisador preparado reteve a sua atividade original até o 6º ciclo. Após, foi observado um ligeiro decréscimo de atividade e após o 9º ciclo de reação foi observado uma atividade da ordem de 90% da atividade original. Estes resultados podem ser atribuídos a forte adsorção da LTL na superfície do suporte, o que evitou uma possível dessorção da mesma por 6 ciclos consecutivos. Por outro lado, a diminuição na atividade catalítica a partir do 7º ciclo, pode ser creditada pelo efeito da retenção de moléculas de água (subproduto da esterificação) no microambiente do biocatalisador, fato que poderia promover a dessorção de algumas moléculas de enzima da superfície do suporte (MOTEEVALIZADEH et al., 2015; RAGHEVENDRA et al., 2010;

SILVA et al., 2014). Além disso, a inativação de moléculas de LTL por influência da temperatura de reação também poderia ocasionar nesta redução da atividade catalítica. Embora tenha sido observado um decréscimo de atividade catalítica após nove ciclos de reação, o biocatalisador preparado mostrou ser altamente ativo e estável após sucessivos ciclos de reação em modo batelada.

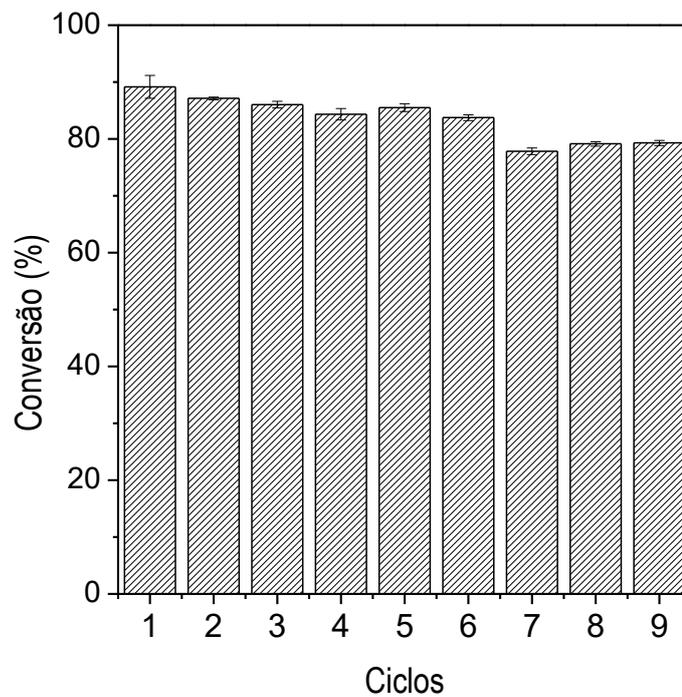


Figura 16 - Teste de estabilidade operacional da LTL immobilizada em Octil-SiO<sub>2</sub> na síntese do estearato de cetila, nas condições ótimas de reação.

Fonte: Do autor.

## 5 CONCLUSÃO

Sílica mesoporosa foi preparada com sucesso utilizando resíduo de biomassa comumente encontrada no Brasil (casca de arroz) e funcionalizada com agente silano (OCTES) para ser usada na imobilização de lipase via ativação interfacial. Diferentes análises foram utilizadas neste estudo para confirmar a funcionalização do suporte, que resultou na criação de um microambiente capaz de aumentar a fixação da enzima e preparar um biocatalisador com alta atividade catalítica em reações de hidrólise e esterificação. Três ésteres foram obtidos com a esterificação catalisada pelo biocatalisador preparado, com conversões da ordem de 94% em tempos de reação inferiores àqueles já reportados na literatura. Dentre eles, estearato de cetila foi escolhido para testes de otimização por ter sido o sistema reacional na qual requereu o menor tempo de reação para ser obtido e por ser uma matéria-prima amplamente utilizada em escala industrial. A otimização da síntese do éster por DCCR possibilitou encontrar a melhor condição para a obtenção do éster, resultando em aproximadamente 90% de conversão com apenas 60 min de reação em meio de hexano. De acordo com os resultados obtidos, a melhor condição para a síntese de estearato de cetila foi obtida com razão equimolar ácido:álcool (1:1) e sem adição de peneira molecular. O biocatalisador preparado foi altamente ativo após 9 consecutivos ciclos de reação de esterificação em meio de hexano. A satisfatória aplicação do suporte preparado na adsorção de LTL pode levar a muitas outras novas aplicações no campo da biocatálise como a imobilização de outras enzimas de grande interesse industrial incluindo lipases de outras diferentes fontes.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Aplicação do suporte preparado na imobilização de outras lipases comumente empregadas em reações de biotransformação;
- b) Produção de ésteres com propriedades lubrificantes em modo contínuo empregando o biocatalisador preparado;
- c) Caracterização físico-química do éster preparado como ponto de fusão, ponto de ebulição, viscosidade cinemática, índice de viscosidade, densidade, índice de acidez;
- d) Produção de ésteres cetílicos empregando ácidos graxos provenientes de óleos vegetais e/ou gorduras animais;

## REFERÊNCIAS

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

AKERMAN, C. O. et al. Biolubrificant synthesis using immobilised lipase: Process optimisation of trimethylolpropane oleate production. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2225-2231, 2011.

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

ALVES, M. D. et al. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal*, v. 311, p. 1-12, 2017.

ALVES, S. M. et al. Tribological behavior of vegetable oil-based lubricants with nanoparticles of oxides in boundary lubrication conditions. *Tribology International*, v. 65, p. 28-36, 2013.

ANAND, O. N.; MEHTA, J.; PRASADA, T. S. R. R. Lubricants components from vegetable oils of indian origin. *Journal of Synthetic Lubrication*, v. 15, p. 97-106, 1998.

ANDERSON-SPRECHER, R. Model comparisons and R-square. *Journal of the American Statistical Association*, v. 48, p. 113-117, 1994.

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

ATABANI, A. E. et al. Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 18, p. 211-45, 2013.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Application of lipase immobilized on the biocompatible ternary blend polymer matrix for synthesis of citronellyl acetate in non-aqueous media: kinetic modelling study. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 57, p. 16-25, 2014.

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

BASSI, J. J. et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 92, p. 900-909, 2016.

BASTIDA, A. et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, p. 486-493, 1998.

BASRI, M. et al. Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. *BMC Biotechnology*, v. 7, p. 53, 2007.

BERNAL, C.; ILLANES, A.; WILSON, L. Improvement of efficiency in the enzymatic synthesis of lactulose palmitate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 3716-3724, 2015.

BI, Y. et al. Biosynthesis of oleyl oleate in solvent-free system by *Candida rugosa* Lipase (CRL) immobilized in macroporous resin with crosslinking of aldehyde-dextran. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, p. 1-5, 2106.

BONDIOLI, P. From oil seeds to industrial products: present and future oleochemistry. *Journal of Synthetic Lubrication*, v. 21, P. 331-43, 2005.

BORGES, M. E.; DIAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 2839-2849, 2012.

BCC Research, 2017. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/marketresearch/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>> . Acesso em: 28 set. 2017).

BLANCO, R. M. et al. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization – Characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 83-93, 2004.

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

BRESSANI, A. P. P. et al. Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: optimization by response surface methodology. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, p. 287-297, 2015.

CAO, L. Carrier-bound Immobilized enzymes. *Wiley-VCH, Weinheim*, 2005.

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

CARRASCO-LÓPEZ, C. et al. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 4365-4372, 2009.

CUI, S. et al. Preparation of amine-modified SiO<sub>2</sub> aerogel from rice husk ash for CO<sub>2</sub> adsorption. *Journal of Porous Material*, v. 24, p. 455-461, 2017.

CHOWDHURY, A. et al. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physicochemical characterization of the product. *Industrial Crops and Products*, v. 52, p. 783-789, 2014.

CHRISTENSEN, M.W.; KIRK; O.; PEDERSEN, C. USA Patent US20030203457 (2003).

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6437-6474, 2013.

DOBÓ, D. G.; BERKESI, D.; KUKOVECZ, A. Morphology conserving aminopropyl functionalization of hollow silica nanospheres in toluene. *Journal of Molecular Structure*, v. 1140, p. 83-88, 2017.

DOMÍNGUEZ, P. et al. Role of apparent pKa of carboxylic acids in lipase catalyzed esterifications in biphasic systems. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*, v. 59, p. 220-224, 2009.

DUPONT, J. et al. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. *Energy & Environmental Science*, v. 2, p. 1258-1265, 2009.

DORMO, N. et al. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solventfree system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 21, p. 229-234, 2004.

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

FERRER, M. et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 391-398, 2005.

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption Isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, v. 156, p. 2-10, 2010.

GERBIG, Y. et al. Suitability of vegetable oils as a industrial lubricants. *Journal of Synthetic Lubrication*, v. 21, p. 177-191, 2004.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. High-yield synthesis of wax esters catalysed by modified *Candida rugosa* lipase. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 509-512, 2008.

GUNCHEVA, M.; DIMITROV, M.; KAMBOUROVA, M. Excellent Stability and synthetic activity of lipase from *B. Stearothermophilus* MC7 immobilized on tin dioxide in environmentally friendly medium. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 27, p. 4317-4322, 2013.

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

GRYGLEWICZ, S.; MUSZYNSKI, M.; NOWICKI, J. Enzymatic synthesis of rapeseed oil-based lubricants. *Industrial Crops and Products*, v. 45, p. 25-29, 2013.

HANRAHAN, G.; LU, K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 36, p. 141, 2006.

HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *Journal of Materials Chemistry*, v. 20, p. 844-857, 2010.

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

HOUSTON, D. F. Rice: Chemistry and technology. *American Association of Cereal Chemists*, p. 517, 1972.

HUANG, M.; LI, L.; ZHENG, S. Mesoporous silica with block copolymer templates: Modulation of porosity via block copolymer reaction with silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 225, p. 9-25, 2016.

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteine in mesoporenen silicaten. *Angewandte Chemie*, v. 47, p. 8582-8594, 2008.

HOUNSTON, D. F. Rice: Chemistry and Technology. *American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN*, 1972.

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

HANDBOOK OF FARMACEUTICAL EXCIPIENTS. 3ª edição. *American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press*, U.S.A., 2000

KANNAN, K., JARSA, R. V. Improved catalytic hydrolysis of carboxy methyl cellulose using cellulase immobilized on functionalized meso cellular foam. *Journal of Porous Materials*, v. 18, p. 409-416, 2011.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 555-569, 2012.

KE, M. et al. Allantoin-loaded porous silica nanoparticles/polycaprolactone nanofiber composites: Fabrication, characterization, and drug release properties. *RSC Advances – Royal Society of Chemistry*, v. 6, p. 4593-4600, 2016.

KOBAYASHI, S. et al. *Polyesters I: Biological systems and biotechnological production*. Wiley-VCH: Weinheim, 3. Ed. 2004.

KUMAR, A.; SHARMA, S. Potential non-edible oil resources as biodiesel feedstock: an Indian perspective. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 1791–1800, 2011.

KUO, C. H. et al. High yield of wax ester synthesized from cetyl alcohol and octanoic acid by Lipozyme RMIM and Novozym 435. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 11694-11704, 2013.

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

LAMSA, M. *Environmentally friendly products based on vegetable oils*. 1995. Tese de doutorado Sc. - Helsinki University of Technology, Helsinki.

LI, D. et al. Synthesis of wax esters by lipase-catalyzed esterification with immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 19, p. 978-982, 2011.

LI, Y. et al. Synthesis of gold nanoparticles on rice husk silica for catalysis applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 54, p. 5656-5663, 2015.

LIMA, L.N. et al. Immobilization of lipase *Pseudomonas fluorescens* on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 42, p. 523-535, 2015.

LIMA, L. C. D.; PERES, D. G. C.; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2018. doi: 10.1007/s00449-018-1929-9

LINDEMANN, L.; GOSALIA, A. The impact of the global raw material landscape on the worldwide lubricants market or vice-versa. In: *Proceedings of the 18<sup>th</sup> TAE International Colloquium Tribology*. Ostfildern, Alemanha. 2012.

LIU, D. et al. Hierarchical porous carbon based on the self-templating structure of rice husk for high-performance supercapacitors. *RSC Advances – Royal Society of Chemistry*, v. 5, p. 19294-19300, 2015.

MACHADO, N. B. et al. Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via physical adsorption. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2018 (artigo submetido para publicação).

MANERA, M. Ácido esteárico y salud cardiovascular. Los ácidos grasos saturados de los alimentos afectan de manera diferente a los niveles de colesterol en sangre. *Consumer*, 2009.

MAYER, F. D. et al. Quantification and use of rice husk in decentralized electricity generation in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 17, p. 993-1003, 2015.

MIMURA, A. M. S. et al. Aplicação da casca do arroz na adsorção dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . *Química Nova*, v. 33, p. 1279-1284, 2010.

MIRANDA, J. S. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. *Chemical Engineering Journal*, v. 251, p. 392-403, 2014.

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

MOTEVALIZADEH, S. F. et al. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 120, p. 75–83, 2015.

NAGENDRAMMA, P., KAUL, S. Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: an overview. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 764–774, 2012.

MASOUMIFARD, N. et al. Zeolitic Core@Shell adsorbents for the selective removal of free glycerol from biodiesel. *ChemSusChem*, v. 8, p. 2093-2105, 2015.

PENG, L. et al. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 523–532, 2002.

QUINCHIA, L. A. et al. Tribological studies of potential vegetable oil based lubricants containing environmentally friendly viscosity modifiers. *Tribology International*, v. 69, p. 110–117, 2014.

RAGHAVENDRA, T.; SAYANIA, D.; MADAMWAR, D. Synthesis of the “green apple ester” ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in MBGs in organic solvents: effects of immobilization and reaction parameters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 63, p. 31–38, 2010.

RAO, A. et al. Phyto-Inspired Silica nanowires: Characterization and application in lipase immobilization. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 4, p. 871-877, 2012.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 147, p. 237–250, 2009.

Research and Markets. 2015. Disponível em: <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-enzymes-market-opportunities-and-forecasts-2014-2020---enzymes-market-is-expected-to-reach-54-billion-worldwide-by-2020-300178106.html> Acesso: 28 setembro de 2017.

SALAZAR-CARREÑO, D.; GARCÍA-CÁCERES, R. G.; ORTÍZ-RODRÍGUEZ, O. O. Laboratory processing of colombian rice husk for obtaining amorphous silica as concrete supplementary cementing material. *Construction and Building Materials*, v. 96, p. 65-75, 2015.

SALES, J. A. A.; PRADO, A. G. S.; AIROLI, C. The incorporation of propane-1,3-diamine in silylant epoxide group through homogeneous and heterogeneous routes. *Polyhedron*, v. 21, p. 2531 – 2651, 2002.

SALIBA, S. et al. Combined influence of pore size distribution as surface hydrophilicity on the water adsorption characteristics of micro-and mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 226, p.221–228, 2016.

SALIHU, A. et al. Esterification for butyl butyrate formation using *Candida cylindracea* lipase produced from palm oil mill effluent supplemented medium. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 7, p. 1159–1165, 2014.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 86-96, 2015.

SERRANO-ARNALDOS, M. et al. Solvent-free enzymatic Production of high quality cetyl esters. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 39, p. 641-649, 2016.

SILVA, N.C.A. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 82, p. 139–149, 2014.

SINGH, L. P. et al. Sol-Gel Processing of silica nanoparticles and their applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 214, p. 17-37, 2014.

SOUZA, M. F.; YAMAMOTO, J. Mullite synthesised from aluminium hydroxide and silica from rice hull. *Cerâmica*, v. 45, p. 34-37, 1999.

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

SHAHABUDDIN, M. et al. Comparative tribological investigation of bio-lubricant formulated from non-edible oil source (Jatropha oil). *Industrial Crops and Products*, v. 47, p. 323–330, 2013.

SHEN, Y. Rice husk silica derived nanomaterials for battery applications – A literature Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 995-1004, 2017.

SSEMPEBWA, J. C.; CARPENTER, D. O. The generation, use and disposal of waste crankcase oil in developing countries: a case for Kampala district, Uganda. *Journal of Hazardous Materials*, v. 161, p. 835–841, 2009.

TAKISAWA, K. et al. Simultaneous hydrolysis esterification of wet microalgal lipid using acid. *Bioresource Technology*, v. 149, p. 16-21, 2013.

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

UNGCHAROENWIWAT, P.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of wax esters from crude fish fat by lipase of *Burkholderia* sp. EQ3 and Commercial Lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 90, p. 359-367, 2013.

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

VESCOVI, V. et al. Improved Catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-glutaraldehyde spacer arms. *Process Biochemistry*, v. 51, p. 2055-2066, 2016.

VESCOVI, V. et al. Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. *Molecules*, v. 22, p. 212, 2017.

VULFSON, E. N. Facile chemo-enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 11, p. 9-18, 1994.

WANG, W. et al. Harvesting silica nanoparticles from rice husks. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, p. 6981-6990, 2011.

WANG, C. F. et al. Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 406, p. 75-83, 2012a.

WANG, W. et al. Silica nanoparticles and frameworks from rice husk biomass. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 4, p. 977-981, 2012b.

WANG, Y. et al. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. *Food Chemistry*, v. 190, p. 629-633, 2016.

WILLING, A. Lubricants based on renewable resource as environmentally compatible alternative to mineral oil products. *Chemosphere*, v. 43, p. 89-98, 2001.

WORLD RICE PRODUCTION 2017/2018. 2017. Disponível em: <<https://www.worldriceproduction.com/>>. Acesso: 28 set. 2017.

WHITBY, R. D. Understanding the global lubricants business. In: Regional markets, economic issues and profitability. 2015, Oxford.

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

YANG, L.; DORDICK, J.S.; GARDE, S. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophysical Journal*, v. 87, p. 812-821, 2004.

YING, Y. et al. Ultrafast Adsorption and selective desorption of aqueous aromatic dyes by graphene sheets modified by Graphene Quantum Dots. *Nanotechnology*, v. 27, p. 245703, 2016.

YU, X. et al. The integrated production of microbial lipids and bio-SiO<sub>2</sub> from rice husks by an organic electrolytes pre-treatment technology. *Bioresource Technology*, v. 153, p. 403-407, 2014.

ZDARTA, J. et al. Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on a silica-lignin matrix as a stable and reusable biocatalytic system. *Catalyst*, v. 7, p. 14, 2017.

ZAINALABIDIN, N.; SALLEH, N. H. M.; ARBAIN, D. Synthesis of MCM-41 from rice husk ash and its utilization for lipase immobilization. *Advanced Materials Research*, v. 925, p. 23-27, 2014.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules*, v. 19, p. 14139-14194, 2014.

ZHANG, S. et al. Rice husks as a sustainable silica source for hierarchical flower-like metal silicate architectures assembled into Ultrathin Nanosheets for adsorption and catalysis. *Journal of Hazardous Materials*, v. 321, p. 92-102, 2017.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZOU, B. et al. Effect of Surface modification of low cost mesoporous SiO<sub>2</sub> carriers on the properties of immobilized lipase. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 417, p. 210-216, 2014.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Recent progress in biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts. *Topics in Catalysis*, v. 55, p. 1081-1100, 2012.