

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

JOÃO PEDRO MIGUEZ

**PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE CATALISADA POR LIPASE
IMOBILIZADA VIA ADSORÇÃO FÍSICA EM SÍLICA DE CASCA DE
ARROZ FUNCIONALIZADA**

Alfenas – MG

2018

JOÃO PEDRO MIGUEZ

**PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE CATALISADA POR LIPASE
IMOBILIZADA VIA ADSORÇÃO FÍSICA EM SÍLICA DE CASCA DE
ARROZ FUNCIONALIZADA**

Defesa de Mestrado submetido à Universidade Federal de Alfenas no
Programa de Pós-Graduação em Química na área de Concentração –
Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Co-orientadora: Prof. Dra. Olga Luisa Tavano

Alfenas - MG

2018

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

M636p Miguez, João Pedro.
Produção de biolubrificante catalisada por lipase imobilizada via adsorção física em sílica de casca de arroz funcionalizada. / João Pedro Miguez. – Alfenas/MG, 2018.
78 f.: il. --

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

1. Sílica. 2. Arroz. 3. Lipase. 4. Química de superfície. 5. Esterificação.
I. Mendes, Adriano Aguiar. II. Título.

CDD-547

João Pedro Miguez

“Produção de biolubrificante catalisada por lipase imobilizada via adsorção física em sílica de casca de arroz funcionalizada”

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: 26/07/2018

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
Unifal-MG

Assinatura: Adriano Aguiar Mendes

Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
Unifal-MG

Assinatura: Joelise de Alencar Figueira Angelotti

Profa. Dra. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo

Instituição: Universidade Federal de Lavras –
UFLA

Assinatura: Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo

RESUMO

SiO₂ amorfa e mesoporosa foi obtida a partir de tratamento termoquímico de casca de arroz e funcionalizada com 3-aminopropil-trietoxissilano (3-APTES) para produzir um suporte com alta densidade de grupos amino (Amino-SiO₂). A etapa de funcionalização foi confirmada por diferentes técnicas como difração de Raio-X (DRX), análise de termogravimetria (ATG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (MFA), fisissorção de N₂ e adsorção de corante rosa de bengala (teste de hidrofobicidade). O suporte funcionalizado foi empregado na preparação de biocatalisadores ativos por adsorção física de lipase microbiana de *Thermomyces lanuginosus* (LTL). O efeito de importantes parâmetros como pH de incubação, temperatura, carregamento inicial de proteína e tempo de contato, no processo de adsorção da enzima foi avaliado. De acordo com os resultados obtidos, a funcionalização melhorou a capacidade de adsorção do suporte. Nas condições ótimas de imobilização (tampão acetato de sódio pH 4,0; 5 Mm; 25 °C e 20 min de incubação), a máxima concentração de proteína adsorvida foi de 12,3 ± 0,1 mg/g de suporte. O biocatalisador preparado exibiu máxima atividade na hidrólise de azeite de oliva emulsificado de 645,8 ± 6,9 UI/g. A adsorção de LTL em Amino-SiO₂ foi um processo de fisissorção. Os dados experimentais de adsorção foram bem ajustados ao modelo de isoterma de Langmuir (R² = 0,9957). A atividade catalítica do biocatalisador em meio orgânico foi também avaliada através da síntese de ésteres por reação de esterificação. Dentre eles, a síntese de oleato de decila, que através de um planejamento utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR), ferramenta que possibilitou obter condições ótimas de operação (30 °C, 21% m/v biocatalisador, 150 rpm e razão molar ácido:álcool de 1:1). Portanto, obtendo máxima conversão percentual do éster em 180 e 105 minutos, de 87%, para um sistema livre de solvente e um sistema contendo isooctano respectivamente. Os testes de reutilização mostraram que o biocatalisador reteve toda a sua atividade original após oito ciclos de reação sucessivos em um sistema livre de solvente. Estes resultados sugerem que este biocatalisador pode ser utilizado com sucesso na síntese de éster através de um processo de tecnologia limpa devido à sua alta atividade catalítica e reutilização.

Palavras-chave: Sílica. Casca de Arroz. Funcionalização. Caracterização. Imobilização de Lipase. Adsorção Física. Síntese do oleato de decila. Otimização. Reusabilidade.

ABSTRACT

Amorphous and mesoporous SiO₂ from rice husks was prepared via thermochemical process and functionalized with triethoxy(amino)silane (3-APTES) to produce a support with high density of amino groups (Amino-SiO₂). The functionalization step was confirmed by several techniques such as X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), scanning electronic microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), N₂ physisorption analysis and Rose Bengal dye adsorption (hydrophobicity test). The functionalized support was then applied in the preparation of active biocatalysts via physical adsorption of microbial lipase from *Thermomyces lanuginosus* (LTL). The effect of certain parameters, including pH of incubation, temperature, initial protein loading and time of incubation, in the adsorption of LTL on Amino-SiO₂ was systematically evaluated. According to results, the functionalization step improved the adsorption of the enzyme on the support surface when compared to the non-functionalized support. Under optimal conditions (5 mM buffer sodium acetate pH 4.0, 25 °C and 20 min of incubation), maximum immobilized protein loading of 12.3 ± 0.1 mg/g was observed. This biocatalyst exhibited maximum activity in the hydrolysis of olive oil emulsion of 645.8 ± 6.9 IU/g. The adsorption of TLL on the functionalized support was a physisorption process. The experimental data of adsorption was well-fitted to the Langmuir isotherm model ($R^2 = 0.9957$). The catalytic activity of the biocatalyst in organic medium was also evaluated through the synthesis of esters by esterification reaction. Among them, the synthesis of decila oleate, through a design using central rotational compound design (DCCR), a tool that allowed to obtain optimal operating conditions (30 °C, 21% m/v biocatalyst, 150 rpm and acid molar ratio: alcohol ratio of 1: 1). Therefore, obtaining maximum percent conversion of the ester at 180 and 105 minutes, of 87%, to a solvent-free system and an isooctane-containing system respectively. The reuse tests showed that the biocatalyst retained all of its original activity after eight successive reaction cycles in a solvent-free system. These results suggest that this biocatalyst can be successfully used in ester synthesis through a clean technology process due to its high catalytic activity and reuse.

Keywords: Silica. Rice husks. Functionalization. Characterization. Lipase immobilization. Physical adsorption. Synthesis of the decila oleate. Optimization. Reusability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida dos biolubrificantes	18
Figura 2 - Reação de epoxidação catalisada por lipase.....	20
Figura 3 - Exemplo das etapas da reação de hidroesterificação.....	20
Figura 4 - Reação química do processo de transesterificação.....	21
Figura 5 - Métodos de imobilização de enzimas.....	24
Figura 6 - Funcionalização de sílica mesoporosa com diferentes grupos funcionais.....	25
Figura 7 - Esquema representativo da reação de esterificação catalisada por LTL imobilizada em Octil-SiO ₂	34
Figura 8 - Esquema representativo da funcionalização da SiO ₂ a partir da casca do arroz com 3-APTES e a adsorção física da LTL no suporte.....	37
Figura 9 - Padrões de DXR para SiO ₂ e Amino-SiO ₂	38
Figura 10 - Análise de termogravimetria (TG) para SiO ₂ e Amino-SiO ₂ em atmosfera de ar sintético.....	39
Figura 11 - Imagens tridimensionais de MFA para SiO ₂ (A) e Amino-SiO ₂ (B).....	41
Figura 12 - Imagens de MEV para SiO ₂ (magnitude de 500× – A, e 20000× – B) e Amino-SiO ₂ (magnitude de 20000× – C)	42
Figura 13 - Ajuste dos modelos não lineares de isoterma aos dados experimentais obtidos para a imobilização de LTL em Amino-SiO ₂ empregando diferentes carregamentos de proteína.....	48
Figura 14 - Efeito do tempo de contato na imobilização de LTL em Amino-SiO ₂ empregando carregamento inicial de proteína de 20 mg/g de suporte	51
Figura 15 - Superfícies de resposta de acordo com o modelo quadrático predito para a síntese enzimática de oleato de decila. Efeito da temperatura e concentração de biocatalisador (A); e efeito da temperatura e razão molar ácido:álcool (B) na porcentagem de conversão em éster.....	57
Figura 16 - Efeito da agitação na porcentagem de conversão.....	60
Figura 17 - Efeito da concentração de peneira molecular na porcentagem de conversão.....	61
Figura 18 - Efeito do tempo de reação na porcentagem de conversão para a síntese de oleato de decila realizada em meio de isooctano e em meio isento de solvente.....	62
Figura 19 - Determinação das velocidades iniciais na síntese de oleato de decila realizada em meio de isoocatno e em meio isento de solvente.....	63
Figura 20 – Estabilidade operacional do biocatalizador após sucessivos ciclos de	

síntese de oleato de decila em meio isento de solvente meio isento de solvente.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biodegradabilidade natural de diferentes flúidos base.....	17
Tabela 2 - Propriedades de SiO ₂ e Amino-SiO ₂	40
Tabela 3 - Parâmetros de imobilização de LTL em SiO ₂ e Amino-SiO ₂ (adsorção física em tampão acetato de sódio pH 5,0 com força iônica de 5 mM, 25 °C e carregamento inicial de proteína de 5 mg/g de suporte).....	44
Tabela 4 - Efeito de pH de incubação nos parâmetros de imobilização de LTL em Amino-SiO ₂	45
Tabela 5 - Influência da concentração inicial de proteína nos parâmetros de imobilização de LTL via adsorção física em Amino-SiO ₂	47
Tabela 6 - Determinação dos parâmetros de isoterma para a adsorção de LTL em Amino-SiO ₂	50
Tabela 7 - Efeito do solvente orgânico na síntese do oleato de cetila via esterificação.....	52
Tabela 8 - Valores codificados e valores atuais (em parênteses) para o planejamento fatorial completo proposto e a porcentagem de conversão de éster obtida na síntese de éster enzimático realizada em meio isoctano.....	54
Tabela 9 - Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de <i>p</i> para síntese enzimática dos ésteres.....	55
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA).....	56
Tabela 11 - Porcentagem experimental de conversão de éster em condições experimentais ótimas.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AE -	Atividade Específica
AH -	Atividade Hidrolítica
BJH -	Modelo Barrett-Joyner-Halenda
DRX -	Difração de Raio X
IUPAC -	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LTL -	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
MER -	Média dos Erros Relativos
MEV -	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA -	Microscopia de Força Atômica
APTES -	3-aminopropil-trietoxisilano
PI -	Proteína Imobilizada
pI -	Ponto isoelétrico
RB -	Corante Rosa de Bengala
TGA -	Análise de termogravimetria
USDA -	Departamento de agricultura dos Estados Unidos
TMP -	Trimetilolpropano
PMMA -	Polimetilmetacrilato
PMA -	Poli-metacrilato
PLL -	Lipase de pâncreas suíno
MJL -	<i>Mucor javanicus</i>
CALA -	<i>Candida sp.</i>
RML -	<i>Rhizomucor miehei</i>
DCCR -	Delineamento composto central rotacional

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Referencial Bibliográfico	16
2.1. Biolubrificantes	16
2.2. Utilização de ésteres sintéticos como biolubrificantes	19
2.3. Esterificação catalisada por lipases	21
2.4. Imobilização de lipases por adsorção	23
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Materiais	27
3.2. Preparação das partículas de sílica via processo hidrotérmico	27
3.3. Funcionalização das partículas de sílica com precursor alcoxisilano	27
3.4. Caracterização de partículas de sílica funcionalizada e não funcionalizada	28
3.5. Procedimento de imobilização da LTL via adsorção física	28
3.5.1. <i>Efeito da funcionalização do suporte</i>	29
3.5.2. <i>Efeito do pH</i>	29
3.5.3. <i>Efeito da temperatura</i>	29
3.5.4. <i>Efeito do carregamento inicial de proteína: Estudos de isoterma de adsorção</i>	30
3.5.5. <i>Efeito do tempo de contato: Estudos mecânicos</i>	31
3.6. Determinação dos parâmetros de adsorção	31
3.7. Procedimento geral de síntese do biolubrificantes oleato de decila	32
3.7.1. <i>Efeito dos Solventes Orgânicos na síntese do éster</i>	34
3.7.2. <i>Efeito da temperatura de reação, concentração de biocatalisador e razão molar ácido:álcool na síntese do éster: Otimização por delineamento central composto rotacional (DCCR)</i>	35
3.7.3. <i>Efeito da agitação na síntese do éster</i>	35
3.7.4. <i>Efeito da concentração da peneira molecular na síntese do éster</i>	35
3.7.5. <i>Efeito do tempo de reação na síntese do éster</i>	36
3.7.6. <i>Testes de reuso</i>	36
4. Resultados e discussão	37
4.1. Caracterização das partículas de sílica funcionalizada e não funcionalizada	38
4.2. Efeito da funcionalização de SiO₂ na imobilização da LTL	43
4.3. Efeito do pH na adsorção de LTL	44

4.4. Efeito da temperatura na adsorção de LTL.....	45
4.5. Efeito do carregamento inicial de proteína na adsorção de LTL: Estudos de isotermas.....	45
4.6. Efeito do tempo de contato na adsorção de LTL.....	51
4.7. Síntese enzimática do biolubrificante (oleato de decila) por esterificação	51
<i>4.7.1 Efeito do solvente orgânico na reação.....</i>	<i>51</i>
<i>4.7.2. Otimização da síntese de éster por delineamento experimental.....</i>	<i>53</i>
<i>4.7.3. Efeito da agitação na síntese do éster.....</i>	<i>59</i>
<i>4.7.4. Efeito da concentração da peneira molecular na síntese do éster.....</i>	<i>60</i>
<i>4.7.5. Efeito do tempo de reação na síntese de éster: comparação entre a síntese de éster em sistemas na presença e na ausência de solvente orgânico.....</i>	<i>61</i>
<i>4.7.6. Ensaio de estabilidade operacional do biocatalisador.....</i>	<i>64</i>
5. Conclusão	65
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	66
Referências	67

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, existem uma grande variedade de lubrificantes, óleos, graxas e outros fluidos funcionais que tem como a sua principal função, diminuir a fricção, transmitir energia, proteger contra a corrosão e desgaste, remover calor, dispersar os resíduos de desgaste, eliminar contaminantes exteriores e atuar como selante (MENEZES *et al.*, 2013). São classificados em 5 grupos: óleos automotivos, óleos industriais, graxas, óleos metálicos (previnem corrosão) e óleos de processo. Curiosamente, 56% dos lubrificantes são utilizados como óleos automotivos, somente 26% são óleos industriais e o restante é composto por óleos processuais, graxas e fluidos de metalurgia (MANG; GOSALIA, 2017).

Neste contexto, a produção de lubrificantes foi estimulada pelo crescimento industrial mundial, e principalmente em virtude do setor automotivo, que teve um crescimento em média de 5% entre 2000 a 2009, sendo que as regiões com maior crescimento foram a América do Sul (Brasil - 7,59%) e a Ásia (China - 24,2% e Índia – 14,56%) (GABRIEL *et al.*, 2011). No ano de 2015, o consumo de lubrificantes foi da ordem de 40 milhões de toneladas, com cerca de 50% dos lubrificantes vendidos em todo o mundo, retornando e poluindo o meio ambiente (MANG; GOSALIA, 2017). Mais de 95% desses materiais, são à base de petróleo e prejudicam o meio ambiente, devido à sua alta toxicidade e baixa biodegradabilidade (SCHNEIDER, 2006). Este fato cria a necessidade do uso de biolubrificantes a partir de fontes renováveis para resolver os problemas ambientais causados por lubrificantes tóxicos à base de petróleo.

Biolubrificantes são lubrificantes que empregam como matérias-primas óleos vegetais, gordura de animais ou matérias-graxas residuais e por este motivo os tornam lubrificantes biodegradáveis e não tóxicos para os seres humanos e outros organismos vivos, em particular ambientes marinhos em que os impactos são mais severos (SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2010). Devido a esses fatores, a procura por lubrificantes que sejam “amigáveis” ao meio ambiente tem aumentado nos últimos anos, conforme foi apresentado no relatório de mercado publicado pela *Transparency Market Research "Biolubricants Market - Global Scenario, Trends, Industry Analysis, Size, Share And Forecast, 2010–2018"*, o mercado global de biolubrificantes foi de US\$ 1,7 bilhão em 2011 e US\$ 2,4 bilhões em 2017, com um crescimento anual de 4,9% de 2011 a 2017 (Transparency Market Research, 2014).

Uma alternativa promissora são os ésteres orgânicos sintéticos que são sintetizados a partir de álcoois e ácidos graxos de cadeia longa oriundos de fontes renováveis. Estes ésteres sintéticos proporcionam uma melhor fluidez quando expostos à baixas temperaturas,

apresentam baixa volatilidade, sendo sua estabilidade térmica e oxidativa melhoradas quando comparados aos óleos vegetais e gorduras animais (MENEZES *et al.* 2012; LÓPEZ *et al.* 2014).

A produção de ésteres sintéticos pode ser realizada utilizando tanto catalisadores homogêneos e heterogêneos (SABOYA *et al.* 2017; LAGE *et al.* 2016; JITPUTTI *et al.* 2006). A utilização das lipases na indústria, como catalisador homogêneo para a síntese de ésteres é moderada, devido ao seu alto custo e sua incapacidade de manter sua atividade em altas temperaturas e na presença de solventes orgânicos. Neste sentido, uma das estratégias capazes de amenizar esses problemas é a imobilização dessas enzimas em suportes sólidos (STEPANKOVA *et al.* 2013; BASSI *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2018). Atualmente, há um crescente interesse na utilização de catalisadores heterogêneos enzimáticos (lipases imobilizadas) (SYAIMA *et al.* 2015) em substituição a catalisadores homogêneos, pois permitem uma melhor separação do catalisador do produto final, proporcionam a reutilização do catalisador, resultando em uma diminuição dos gastos com a produção, e com a purificação do produto tornando-o sustentável (COMAN; PARVULESCU, 2013).

A escolha do suporte a ser utilizado é muito importante na preparação do biocatalisador. Uma gama de suportes (naturais ou sintéticos) se mostram promissores para a imobilização de lipases como sílica, zircônio, dióxido de titânio e partículas magnéticas (BERNAL *et al.* 2018; VENDITTI *et al.* 2015; ŽIVKOVIC *et al.* 2015). Suportes à base de sílica são os mais utilizados devido às suas características, tais como grande área superficial, tamanho uniforme dos poros, alta estabilidade térmica e mecânica e baixa toxicidade (DORCHEH; ABBASI, 2008). Além disso, a superfície da sílica pode ser modificada quimicamente com diversos grupos funcionais com o intuito de melhorar a sua capacidade de retenção de enzimas (HARTMANN; KOSTROV, 2013). A produção de sílica pode ser feita a partir do processo de sol-gel, usando diferentes precursores silano (DORCHEH; ABBASI, 2008) ou por meio de um processo termoquímico utilizando resíduos agroindustriais como, casca de arroz, bagaço de cana de açúcar, folhas de bambu, etc (BHIMA *et al.* 2015; VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estima que a produção mundial de arroz entre os anos de 2017 e 2018 seja de aproximadamente 718,48 milhões de toneladas (STATISTA, 2018a). No Brasil, esta produção foi de 12,3 milhões de toneladas em 2017 (STATISTA, 2018b). Atualmente, a indústria utiliza os resíduos gerados no processo de beneficiamento, principalmente, para a produção de sílica destinada à construção civil (SILVA;

BRITO; DHIR, 2014). Portanto, se faz necessária a sua utilização em setores inteligente dessas sobras provenientes da agricultura.

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi a síntese de um éster com propriedades lubrificantes como oleato de decila por reação de esterificação catalisada por lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizada. Esta lipase foi selecionada devido à sua elevada atividade catalítica na síntese de diferentes ésteres, incluindo aqueles com propriedades lubrificantes (BASSI *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2018). O biocatalisador heterogêneo foi preparado por adsorção física em partículas de SiO₂ obtidas a partir do tratamento hidrotérmico de casca de arroz. Com o intuito de melhorar a capacidade de adsorção do suporte obtido, foi empregada a etapa de funcionalização com 3-aminopropil-trietoxissilano (3-APTES). O efeito de alguns fatores no processo de preparação do biocatalisador e na síntese do éster foi avaliado. Embora a aplicação de biocatalisadores heterogêneos na síntese de ésteres com propriedades lubrificantes seja muito bem documentada, a aplicação deste suporte na preparação destes biocatalisadores ainda não é reportada, mostrando a relevância da execução deste projeto. Além disso, a síntese enzimática de oleato de decila em meio de solventes orgânicos tem sido descrita em prévios estudos (CHANG *et al.*, 2001; RANI *et al.*, 2015; AULAKH *et al.*, 2017). Entretanto, estes estudos não relatam testes de estabilidade operacional após consecutivos ciclos de reação, porém estes testes foram realizados em meio isento de solventes orgânicos para demonstrar a relevância de execução do projeto proposto.

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

- a) Preparação das partículas de sílica por tratamento térmico, funcionalização com 3-APTES e caracterização do suporte por diferentes técnicas;
- b) Avaliação da influência de pH, temperatura, carregamento inicial de proteína e tempo de incubação no processo de adsorção da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e atividade catalítica na hidrólise da emulsão de azeite de oliva;
- c) Estudos de isotermas de adsorção para a elucidação do processo de preparação do biocatalisador;

- d) Aplicação do biocatalisador heterogêneo preparado na síntese de biolubrificante (oleato de decila) por esterificação – Avaliação do efeito de relevantes fatores (solvente orgânico, temperatura, concentração de biocatalisador, razão molar ácido:álcool, agitação, concentração de peneiras moleculares e tempo de reação) na síntese do éster;

Testes de estabilidade operacional (reuso) do biocatalisador nas condições ótimas de reação de esterificação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biolubrificantes

O uso de óleos naturais e gorduras derivadas de plantas e animais (soja, palma, sebo e banha) como lubrificantes é datado desde os tempos antigos. Na antiguidade, os egípcios utilizavam graxa a base de sabão de cálcio de azeite de oliva como lubrificante no eixo das rodas em carruagens (ZAINAL *et al.* 2018). No fim do século 18, a revolução industrial impulsionou a demanda por óleos naturais para serem utilizados como lubrificantes como óleo de banha, óleo de oliva, óleo de colza, óleo de casca de amendoim, etc. Na contramão, os anos seguintes a exploração do petróleo diminuiu o interesse e a necessidade de pesquisa utilizando óleos naturais devido principalmente ao seu baixo custo de exploração, mas impulsionou a pesquisa e desenvolveu a tecnologia da lubrificação para aplicação industrial (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017). Biolubrificantes são amplamente utilizados em produtos no setor cosmético como removedor de maquiagem, hidratante facial, creme anti-idade, protetor solar, maquiagem para os olhos, creme para mãos e pés, condicionador, loção pós-barba e creme para os olhos (RANI *et al.*, 2015; Truth in Aging, 2018; Acme-Hardesty, 2018). Um importante representante é o oleato de decila é um importante éster de ácido graxo de cadeia longa com propriedades lubrificantes (éster de cera), tem sido sintetizado pela reação de esterificação usando catalisadores químicos como o ácido *p*-toluenossulfônico e derivados de organoestanhos (HILLS, 2003).

Lubrificantes são essenciais em quase todos os aspectos para o bom funcionamento das máquinas modernas, são chamados assim, substâncias utilizadas para lubrificar superfícies que estão em contato mútuo, facilitando o movimento dos componentes, reduzindo o atrito e o desgastes das peças. Quando os lubrificantes são utilizados de maneira correta, o maquinário terá um aumento em sua vida útil e um aumento na sua eficiência (ZAINAL *et al.* 2018). Um bom lubrificante tem de apresentar as seguintes características: alta viscosidade, alto ponto de ebulição, boa estabilidade térmica, baixo ponto de congelamento, capacidade de prevenir a corrosão do material e ter alta resistência a oxidação. Os lubrificantes podem ser classificados de acordo com sua aparência física: sólidos (grafite, bissulfeto de molibdênio), semi sólidos (graxa) e líquidos (petróleo, óleos animais e vegetais) (MOBARAK *et al.* 2014).

Biolubrificantes podem ser definidos como produtos com baixa toxicidade e excelente biodegradabilidade. Biodegradabilidade por definição é a capacidade do material se

desintegrar por microrganismos, fungos e enzimas. A taxa de biodegradabilidade, depende da estrutura química do óleo de base ou dos componentes aditivos. O ambiente onde ocorre também auxilia no processo de biodegradação. Para que o processo ocorra deve-se haver um crescimento microbiano apropriado, oxigênio e temperatura adequados, a quantidade de alimento necessária, é encontrada nos óleos que serão biodegradados (GNANASEKARAN; CHAVIDI, 2018). Como podemos observar na Tabela 1, os ésteres, os polióis e o óleos vegetais possuem uma melhor biodegradabilidade que os óleos de origem mineral.

Tabela 1 - Biodegradabilidade natural de diferentes flúidos base.

Tipo de fluidos	Biodegradabilidade (%) de acordo com o método, CEC-L-33-A-94, em 21 dias
Óleo Mineral	20-40
Óleo Vegetal	90-98
Ésteres	75-100
Polióis	70-100
Trimetilatos	0-70

Fonte : GNANASEKARAN; CHAVIDI, 2018

Os biolubrificantes podem ser classificados como sustentáveis pois são derivados de matérias primas renováveis (ZAINAL *et al.* 2018). Os materiais sustentáveis podem ser classificados por dois aspectos, pela origem dos seus recursos e pela poluição causada por ele. Os biolubrificantes são descartados por diversas vias, e seus componentes químicos são desintegrados em água e dióxido de carbono. Porém, nesse caso o ciclo do carbono é fechado, pois a quantidade de dióxido de carbono liberado na atmosfera é a mesma quantidade de dióxido de carbono absorvido pelas plantas. Portanto, não há relação com o equilíbrio do dióxido de carbono na atmosfera. Por outro lado, os óleos de origem mineral como petróleo aumentam a quantidade de dióxido de carbono na atmosfera, levando ao aquecimento global, que pode ser considerado um tipo de poluição indireta (ZAINAL *et al.* 2018). O ciclo de vida dos lubrificantes derivados de fontes renováveis demonstra-se na Figura 1. Seja uma poluição indireta ou direta, a preocupação com a saúde ambiental vem ganhando notoriedade. Por conta disso, faz-se necessário o uso de lubrificantes que sejam biodegradáveis e produzidos por meio de fontes renováveis e sustentáveis (GNANASEKARAN; CHAVIDI, 2018).

Os óleos de origem vegetal são ótimos substitutos aos óleos de origem mineral derivados do petróleo, seu principal componente são os triacilgliceróis (98%), formados por três grupamentos hidroxila que são esterificados a grupos carboxilas de ácidos graxos. A alta viscosidade dos óleos vegetais é atribuída ao seu alto peso molecular. Sua estrutura também é a responsável pela sua estabilidade frente a uma grande faixa de temperatura na qual podem operar. Porém, os biolubrificantes também apresentam uma série de desvantagens, como a limitação de operação em baixas temperaturas levando a solidificação e gerando o entupimento de filtros, são sensíveis a hidrólise e oxidação e sofrem degradação térmica (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017). Uma alternativa seria a utilização de aditivos, porém isso poderia afetar sua biodegradabilidade e iria encarecer o produto final, entretanto pesquisas alterando quimicamente a estrutura dos biolubrificantes por meio de reações químicas, podem amenizar as características desvantajosas dos biolubrificantes apresentadas anteriormente (SALIH; SALIMON; YOUSIF, 2011, SABOYA *et al.* 2017).

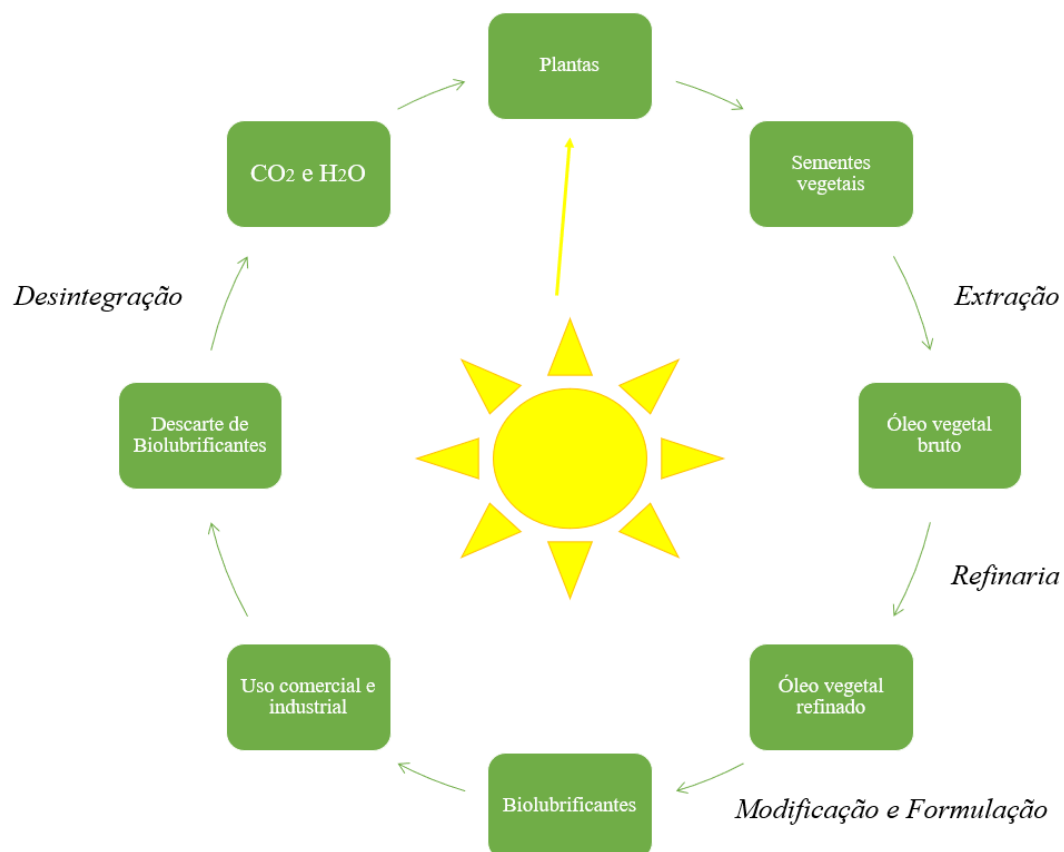


Figura 1 - Ciclo de vida dos biolubrificantes.

Fonte: adaptado de ZAINAL *et al.* 2018.

2.2 Utilização de ésteres sintéticos como biolubrificantes

Biolubrificantes são um tipo de éster, que quando comparados com óleos naturais, tem um melhor comportamento a baixas temperaturas, apresentam baixa volatilidade e ponto de fulgor e exibem uma alta estabilidade termo-oxidativa. Os ésteres sintéticos apresentam uma considerável afinidade pela superfície dos metais assim como os óleos naturais, isso deve-se principalmente ao seu alto grau de polaridade, proporcionando a formação de monocamadas, minimizando o contato superficial (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012). Podem ser sintetizados por intermédio de uma reação chamada esterificação de Fischer, que é uma reação de substituição nucleofílica do grupamento acila catalisada por um ácido de Lewis ou Brønsted, envolvendo um ácido carboxílico e um álcool (CALVALCANTE *et al.* 2015). As reações de esterificação são aplicadas de diversas maneiras na indústria química, de alimentos e farmacêutica (PAPADAKI *et al.* 2017; SÁ *et al.* 2017).

Na indústria os ésteres são produzidos utilizando ácidos inorgânicos como catalisador homogêneo, principalmente o ácido sulfúrico, dessa forma, esses catalisadores geram uma quantidade considerável de resíduos ácidos, que necessitam de um pós-tratamento para que seja realizada apropriadamente seu descarte. O ácido sulfúrico também é altamente corrosivo e tóxico, tornando a reação pouco atrativa industrialmente (BONDIOLI, 2004). Uma alternativa mais ambientalmente sustentável é a utilização de enzimas como catalisador na produção de ésteres. As enzimas são biocatalisadores não tóxicos e com alta versatilidade na catálise de reações utilizando condições amenas, têm alta eficiência, químio-, régio- e estéreo-seletividade, possuem uma ampla matriz de substratos e capacidade de realizar reações orgânicas em diversos meios reacionais (SHINDE; YADAV, 2014; BADGUJAR; BHANAGE, 2015). Os ésteres podem ser sintetizados por diferentes rotas como epoxidação (AOUF *et al.* 2014, KERN *et al.* 2016), transesterificação (KERN *et al.* 2016), hidroesterificação (BRESSANI *et al.* 2014) e esterificação direta (STEPANKOVA *et al.* 2013; SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2010). Essas reações são catalisadas principalmente por catalisadores homogêneos (ácidos e bases inorgânicas, enzimas solúveis, etc) ou catalisadores heterogêneos (resinas, enzimas imobilizadas, etc) (PANCHAL *et al.* 2017).

Epoxidação é uma reação muito importante para os ácidos graxos não saturados, é uma reação de funcionalização das duplas ligações C-C para melhorar a estabilidade oxidativa, lubrificação e o comportamento em baixas temperaturas dos biolubrificantes (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017). Os métodos variam de acordo com a natureza dos reagentes e

os catalisadores que são utilizados. A reação de epoxidação *in situ* ocorre principalmente em duas etapas: primeiro ocorre a formação do peróxi-ácido, e então ocorre a reação do peróxi-ácido com a ligação dupla não saturada. A instauração etilênica então é convertida em um epóxido, dependendo de diversos fatores, como a proporção da instauração etilênica no ácido carboxílico, temperatura, catalisador, concentração do catalisador, agitação e tempo de adição do H_2O_2 (PANCHAL *et al.* 2017). São reações de alquenos peróxidos ácidos, formando grupos epóxidos, a reação é seguida pela abertura do anel epoxidado, tal como um processo de esterificação, convencionalmente os métodos de epoxidação são catalisadas com a utilização de resinas, enzimas e metais (ZAINAL *et al.* 2018).

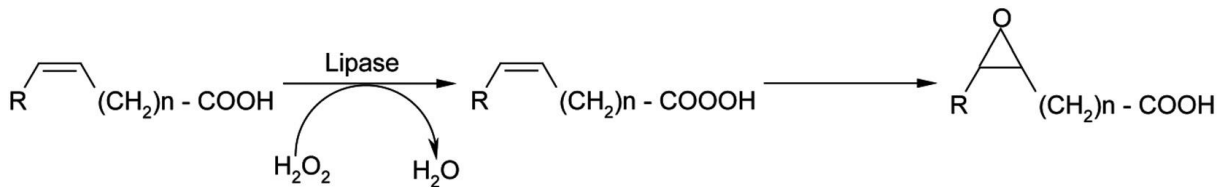


Figura 2 - Reação de epoxidação catalisada por lipase.
Fonte: AOUF *et al.* 2014.

Uma outra rota que é amplamente utilizada para a obtenção de ésteres, consiste na hidroesterificação (BRESSANI *et al.* 2014). Hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise seguido de uma etapa de esterificação. A hidrólise consiste de uma reação química entre a gordura ou óleo com água, produzindo glicerina e ácidos graxos (incluindo, mono e diglicerídeos). Após a hidrólise, a glicerina é removida e os ácidos graxos obtidos são então esterificados utilizando um álcool, que neutraliza a acidez presente no produto, sintetizando ésteres com alto grau de pureza. Um dos subprodutos obtidos na reação, é a água, que pode ser reutilizada no processo de hidrólise (MACHADO *et al.* 2016; AGUIEIRAS *et al.* 2014).

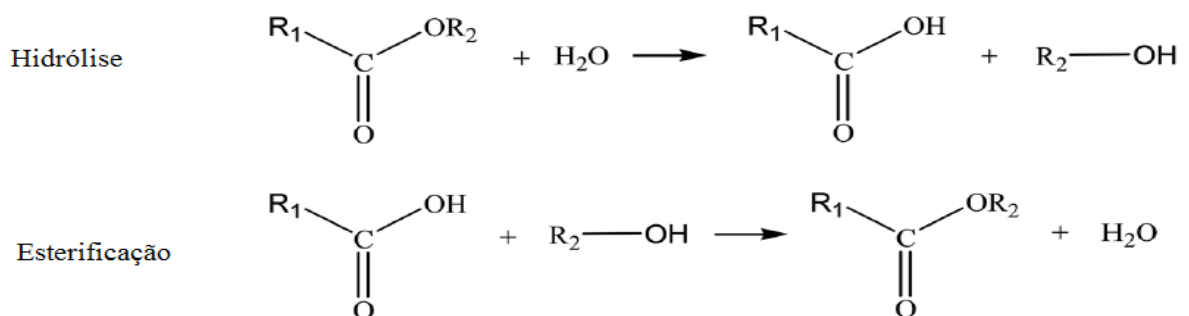


Figura 3 - Exemplo das etapas da reação de hidroesterificação.
Fonte: AOUF *et al.* 2014.

Transesterificação é uma reação na qual um éster é transformado em outro éster por meio da troca do grupo alquil. A transesterificação de óleos vegetais auxilia na síntese de uma variedade de ésteres de alquila de ácidos graxos, por meio da reação de óleos vegetais com uma variedade de álcoois com diferentes tamanhos de cadeias (PANCHAL *et al.* 2017). A estequiometria da reação requer um mol de triglicerídeo e três mols de álcool, onde esse excesso é utilizado para otimizar a quantidade de alquil éster produzido e ajudar na separação do produto final do glicerol formado. A reação pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas, os ésteres produzidos provenientes dos óleos naturais podem ser utilizados como lubrificantes (PANCHAL *et al.* 2017). A reação aumenta a termo estabilidade do lubrificante, evitando sua autopolimerização para formar ácidos graxos livres (ZAINAL *et al.* 2018).

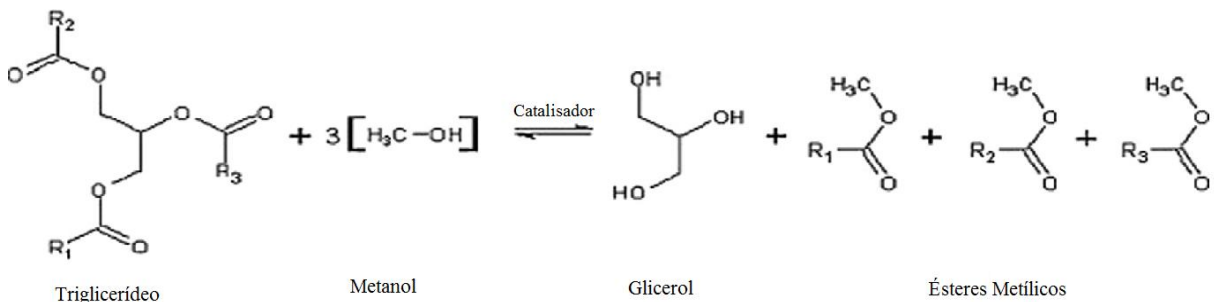


Figura 4 - Reação química do processo de transesterificação.
Fonte: ZAINAL *et al.* 2018.

2.3 Esterificação catalisada por lipases

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) desempenham um importante papel na síntese orgânica de ésteres utilizados na indústria de biolubrificantes (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017; ZAINAL *et al.* 2018). Elas são enzimas responsáveis pela hidrólise de lipídeos em ácidos graxos e glicerol, e quando em contato com ambientes com baixa concentração de água e/ou na presença de solventes orgânicos, as lipases são capazes de catalisar reações de biotransformação, tais como transesterificação, hidroesterificação e a interesterificação (ADLERCREUTZ, 2013; LAGE *et al.* 2016). As lipases são abundantes na natureza e são encontradas em diversos organismos e tecidos, sendo que uma das fontes mais importantes de lipases utilizadas para aplicações industriais são os fungos, as leveduras e as lipases provenientes de fontes microbianas (GUPTA *et al.* 2015; ADLERCREUTZ, 2013).

Os ésteres podem ser produzidos tanto quimicamente quanto por enzimas, entretanto, quando catalisado por enzimas essa reação apesar de complexa possui inúmeras vantagens: a

reação é muito mais seletiva, apresenta alta especificidade e baixo impacto ambiental, o consumo de energia é mais baixo, pois a reação pode ser realizada em condições amenas, a reação ocorre com ausência de subprodutos tóxicos, etc. As lipases são as preferidas para esse tipo de reação, devido a sua alta atividade, estabilidade e capacidade de utilizar uma grande faixa de substratos (SILVA *et al.* 2015). A utilização de lipases de diferentes fontes na síntese de ésteres por esterificação de ácidos graxos com álcoois, os quais podem ser utilizados como lubrificantes, tem sido amplamente reportada pela literatura.

No trabalho de Åkerman *et al.* (2011a), a síntese do oleato de trimetilopropano por esterificação de trimetilopropano (TMP) e ácido oleico foi catalisada por lipase B da *Candida antarctica* imobilizada comercialmente disponibilizada pela Novozymes (Novozym[®] 435). Nas condições experimentais empregadas, o rendimento da reação para a formação do tri éster foi de 80% em 24 h de reação. O produto se mostrou um bom lubrificante e de baixo impacto ambiental, também foi constatado que a formação do tri-éster foi facilitada quando a reação foi exposta à altas temperaturas e com grande quantidade do biocatalisador. Porém, o processo demandou uma alta temperatura (70°C). Nessa temperatura, do biocatalisador teve uma perda de 20% de eficiência após 24 h e de 50% após 94 h de reação.

Em um subsequente estudo, diferentes ésteres foram também produzidos por esterificação de trimetilolpropano (TMP) com ácidos carboxílicos de C5 a C18, utilizando diversos catalisadores heterogêneos, dentre eles a lipase B da *Candida antarctica*, imobilizada em matriz de polimetilmetacrilato (Åkerman *et al.*, 2011b). A lipase não demonstrou atividade na síntese do éster quando utilizado o ácido C5, porém a enzima mostrou melhoras significantes em sua atividade, conforme a cadeia do ácido aumentava. A reação ocorreu a 70°C e a estequiometria foi de 1,5 mol de ácido oleico (90%) e 0,5 mol de TMP. Observando a síntese do ester-C18, a produção por rota enzimática foi similar aos outros catalisadores heterogêneos (químicos clássicos).

Num estudo recente reportado por Lage *et al.* (2016), utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizada em partículas mesoporosas de polimetacrilato(PMA) por adsorção física, realizou a síntese de oleato de isoamila para ser utilizado como biolubrificante. De acordo com os resultados a conversão máxima foi por volta de 85%, e alcançada após 30 min de reação sob agitação contínua (200 rpm), razão molar ácido:álcool de 1:1, 45°C e concentração de biocatalisador de 20% m/v na qual foi preparado utilizando 100 mg de proteína/g de suporte. Nas condições ideais de reação, o biocatalisador manteve sua atividade inicial por vinte dois ciclos, perdendo 8,6% da sua atividade subsequentemente.

Bassi *et al.* (2016) sintetizaram oleato de n-octila por esterificação enzimática do ácido oleico e n-octanol em meio isento de solvente. Os autores empregaram lipases de pâncreas suíno (PLL), *Mucor javanicus* (MJL) *Candida sp.* (CALA), *Rhizomucor miehei* (RML) e a *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizadas via adsorção física em partículas de poli-metacrilato (PMA) como biocatalisadores. Dentre eles, PMA-LTL foi o que obteve a maior atividade catalítica na hidrólise de emulsão de azeite de oliva ($217,8 \pm 1,1$ UI/g) e concentração de proteína imobilizada ($37,5 \pm 0,4$ mg/g). A sua atividade também foi a mais elevada na síntese do oleato de n-octila e uma conversão de $95,1\% \pm 1,3\%$ após 60 min de reação a 45°C e 10% m/v de LTL-PMA, razão molar do ácido oleico e o n-octanol de 1:1,5 foi observada.

2.4 Imobilização de lipases por adsorção física

O uso de biocatalisadores homogêneos (enzimas) acarreta em algumas desvantagens econômicas sob o processo industrial devido a sua baixa estabilidade em contato com solventes, a altas temperaturas, mecânica e operacional, e devido ao fato de não poder ser reutilizado no processo, que levam ao aumento do custo na produção. Para superar essas limitações, foi realizado o desenvolvimento de novas técnicas avançadas de imobilização oferecendo uma gama de vantagens processuais que diminuem o custo de produção, aumentam a atividade, especificidade e seletividade do biocatalisador, aumentam sua estabilidade estrutural, e a separação do biocatalisador do meio reacional torna-se mais fácil, podendo ser recuperado e então reutilizado devido a suas características heterogêneas, diminuindo assim o custo de produção (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; FERRAZ *et al.* 2015; ADLERCREUTZ, 2013, VENDITTI *et al.* 2015; NARWAL *et al.* 2016). As principais desvantagens do processo de imobilização de enzimas são: possíveis alterações na conformação natural da enzima e o alto custo dos suportes utilizados durante o processo de imobilização (SHELDON; PELT, 2013).

A imobilização de enzimas pode ser realizada de diferentes maneiras. Os tipos de imobilização podem ser classificados de diversas maneiras como mostrado na Figura 5.

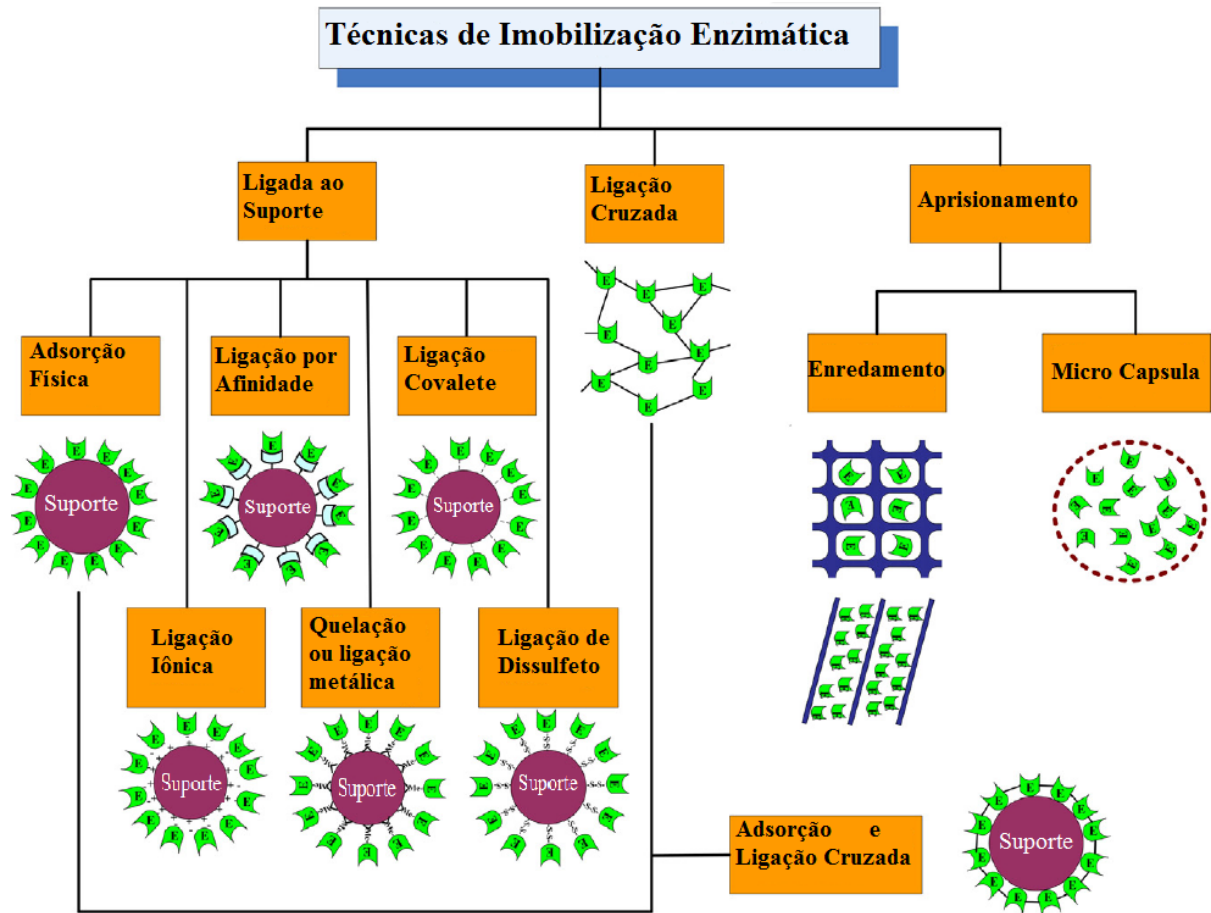


Figura 5 - Técnicas de imobilização enzimática.
Fonte: ZHAO *et al.* 2015.

Como podemos ver na Figura 5 os métodos de imobilização podem ser divididos em três categorias: ligação cruzada, aprisionamento e ligação direta a um suporte (SHELDON; PELT, 2013). Cada método pode influenciar a enzima e as suas propriedades como atividade, estabilidade e seletividade (HANEFELD; CAO; MAGNER, 2013). O tipo de imobilização por ligação cruzada oferece alta estabilidade, mas pode causar um alto impedimento estérico pelo substrato, impossibilitando o mesmo de alcançar a sítio ativo da enzima (ZHOU *et al.* 2014). Enquanto a imobilização enzimática por aprisionamento em microesferas ou membrana ocorre, frequentemente, a ineficiência do contato entre a enzima e o meio reacional onde encontra-se o substrato (CHEN *et al.* 2011; KLEIN *et al.* 2011). Por último, o método baseado em adsorção física na superfície dos suportes insolúveis em água (WU; LIA, 2008) causando pouca ou nenhuma mudança conformacional da estrutura da enzima ou destruição do seu sítio ativo. É um método mais simples e barato se for utilizado um suporte adequado.

O método de adsorção de enzimas faz o uso de interações físicas geradas entre o suporte e a enzima que incluem, forças de van der Waals, interações iônicas e ligação de hidrogênio.

As enzimas podem ser imobilizadas em diferentes tipos de materiais, orgânicos ou inorgânicos (JESIONWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Dos materiais inorgânicos porosos, o mais comumente utilizado para a imobilização de enzimas por adsorção física é a sílica (porosa). É um método amplamente utilizado devido a sua simplicidade, pois a sílica não necessita de uma funcionalização prévia de sua superfície (HARTMANN; KOSTROV, 2013). Porém, as enzimas, por estarem somente adsorvidas na superfície da sílica podem sofrer com mudanças em sua estrutura, desencadeadas por alterações menores das condições de reação, como alterações de temperatura, pH, ou variações na concentração do substrato. Para resolver esse tipo de problema, foram propostas diferentes mudanças na estrutura da superfície da sílica para melhorar a ligação entre a enzima e o suporte (HARTMANN; KOSTROV, 2013). Um dos exemplos é melhorar as interações eletrostáticas entre a enzima e o suporte, estudos recentes (ZHOU; HARTMANN, 2012) mostraram que as interações eletrostáticas entre a superfície do suporte e a enzima, tornaram-se mais fortes quando a adsorção foi realizada em um pH, onde a enzima possuía uma carga carregada positivamente e o suporte de sílica possuía uma carga negativa (HARTMANN; KOSTROV, 2013).

Na Figura 6 podemos observar diferentes tipos de modificação na superfície da sílica que podem alterar o modo com que o suporte interage com a enzima por interações eletrostáticas.

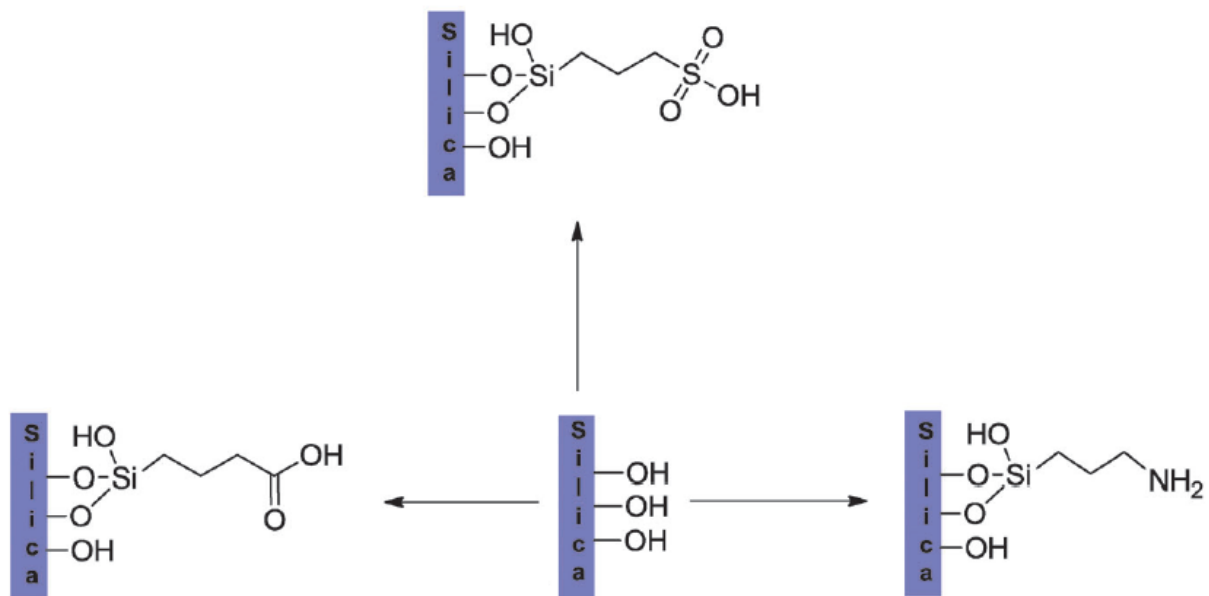


Figura 6 - Funcionalização de sílica mesoporosa com diferentes grupos funcionais.

Fonte: Adaptado de HARTMANN; KOSTROV, 2013.

A escolha do suporte é muito importante, a hidrofobicidade ou hidrofília do suporte terá uma forte influência no comportamento de imobilização e na atividade catalítica da enzima imobilizada (HARTMANN; KOSTROV, 2013). As lipases têm como determinante suas

interações hidrofóbicas. Sörensen *et al.* (2010) imobilizaram LTL em suportes hidrofílicos e hidrofóbicos e foi observada que a atividade específica da lipase em suporte hidrofóbico, da ordem de 14 EU/min, foi superior aos valores obtidos para suporte hidrofílico (5,5 EU/min), mesmo que o carregamento tenha apresentado o inverso – o suporte hidrofílico obteve um carregamento de proteína imobilizada de 1,30 mg/g enquanto o suporte hidrofóbico de 0,77 mg/g. Os autores atribuem estes resultados às diferentes estruturas dos suportes como tamanho e a quantidade dos poros e, conseqüentemente, à problemas de transferência de massa.

Neste sentido, o objetivo deste mestrado foi sintetizar um éster com propriedades lubrificantes como oleato de decila por esterificação direta de ácido oleico e decanol. A seleção deste éster como modelo de reação é devido à sua aplicação na cosmetologia (RANI *et al.*, 2015; ACME-HARDESTY, 2018). A produção do éster foi catalisada por lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) imobilizada via adsorção física (interações iônicas) em um suporte preparado a partir da funcionalização de SiO₂ com grupos aminopropil empregando 3-APTES como agente de silanização. O suporte testado foi obtido a partir do tratamento hidrotérmico de casca de arroz. A estratégia proposta neste projeto é bastante atrativa em virtude da relevância da aplicação de enzimas imobilizadas na síntese de importantes compostos do ponto de vista industrial como biolubrificante. O suporte empregado foi obtido de um resíduo agroindustrial facilmente encontrado no Brasil que tem sido amplamente usado na construção civil. É importante ressaltar que a estratégia proposta ainda não foi reportada pela literatura especializada, mostrando o caráter inovador deste projeto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi comprada da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os reagentes, a casca do arroz foi adquirida da empresa Arroz Rei de Ouro Ltda. (Itajubá, MG, Brasil). 3-aminopropil-trietoxissilano (3-APTES) e Rosa de Bengala foram comprados da Sigma-Aldrich. Álcool 1-decanol, ácido oleico comprado da Sigma-Aldrich. A peneira molecular UOP de 3 Å (forma de bastão e tamanho 1/16 pol) foi adquirida da Fluka Analytical (St. Louis, MO, EUA). A albumina sérica bovina foi adquirida da Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, EUA). A goma arábica foi comprada da Synth[®] e o óleo de oliva (baixa acidez-Carbonel) foi adquirido em mercado local (Alfenas, MG, Brasil). Os demais produtos químicos e solventes orgânicos foram de grau analítica adquiridos da Synth[®] e Vetec Química Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Preparação das partículas de sílica via processo hidrotérmico

As partículas de sílica foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Zhang et al. (2017), com pequenas modificações. Inicialmente, as cascas de arroz foram secas durante a noite em um forno à 80°C. 30 g de casca de arroz secas foram submetidas a refluxo com 400 mL(v/v) de solução de água deionizada com ácido clorídrico (35% m/m) na proporção de 9:1, respectivamente, durante 2 horas a 120°C para remoção das impurezas metálicas. As cascas de arroz tratadas foram filtradas, lavadas cuidadosamente com água deionizada e calcinadas em um mufla a 700°C durante 4 horas para produzir partículas de SiO₂ (sílica). A porcentagem de produção de SiO₂ foi de 11,2 ± 1,1% com base na massa seca inicial.

3.3 Funcionalização das partículas de sílica com precursor alcoxisilano

A preparação do Amino-SiO₂ usando 3-APTES foi realizada segundo a metodologia descrita por Vescovi *et al* (2016). Uma suspensão contendo 1g de SiO₂ seco e 20 mL de uma mistura de precursor de alcoxisilano 3-APTES e tolueno (na proporção de 3-APTES: tolueno de 1:10 v/v) foi mantida sob refluxo durante 4 horas a 120°C. O suporte funcionalizado foi filtrado em um funil de Buchner à vácuo, usando papel de filtro Whatman no. 41, e

cuidadosamente lavado com acetona, etanol 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 $2\theta=5-50^\circ$. Análises de termogravimetria (ATG) foram realizadas com unidade SD Q600 (TA Instrumentos). As amostras (10 mg) foram examinadas em atmosfera de ar sintético no intervalo de 30 a 900 °C com rampa de aquecimento de 10 °C/min. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram adquiridas no equipamento Quanta 200 FEI sob vácuo operando na voltagem de 5kV. 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), fisisorção de N_2 , com instrumento LMA-sorp com degaseificação a 250 °C por 4 horas antes da análise. O modelo Barrett-Joyner-Halenda (BJH) foi aplicado para determinar o volume de poro e o diâmetro médio de poro. Imagens de microscopia de força atômica (MFA) foram adquiridas usando microscópio Cypher Es (Asylum Research) com área superficial escaneada de 1 x 1 μm .

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. 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 horas. A absorbância obtida do sobrenadante antes e após o processo de adsorção foi medida espectrofotometricamente a 549 nm. A concentração do corante adsorvido foi determinada utilizando a curva de calibração no intervalo de 0,25 a 5 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,99988$). Estes testes foram realizados em triplicata.

3.5 Procedimento de imobilização da LTL via adsorção física

O procedimento de imobilização da LTL em Amino- SiO_2 foi realizada de acordo com prévios estudos realizados no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG (MIRANDA *et al.* 2014; ALVES *et al.* 2017). 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 a 25°C por incubação em shaker orbital (200 rpm). A quantidade de enzima imobilizada foi de 5 mg/g de suporte. 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 através da concentração de proteína desaparecida do sobrenadante. Após a imobilização, o biocatalisador preparado foi estocado a 4 °C por 24 h. Neste estudo, os biocatalisadores foram preparados em baixa força iônica (solução tampão de 5 mM) para evitar uma possível competição entre os íons obtidos na solução enzimática e com 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 do suporte nos parâmetros de imobilização foi avaliado pelo uso da sílica não funcionalizada (SiO₂) em comparação ao suporte funcionalizado (Amino-SiO₂). O procedimento de adsorção foi realizado em tampão acetato de sódio pH 5,0 (5 mM) com carregamento inicial de proteína de 5 mg/g para evitar problemas difusivos por 15 h de incubação a 25°C e 200 rpm.

3.5.2 Efeito do pH

O efeito do pH entre 3 e 9 com força iônica de 5 mM (tampão acetato de sódio pH 3,0, 4,0, 5,0, tampão fosfato de sódio pH 6,0, 7,0, 8,0 e tampão carbonato de sódio pH 9,0) nos parâmetros de imobilização também foi estudado. O carregamento de proteína foi de 5 mg/g de suporte. As suspensões foram mantidas sob agitação (200 rpm) por 15 h em shaker orbital a 25°C.

3.5.3 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura nos 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 4,0 e a suspensão enzima:suporte foi também mantida sob agitação de 200 rpm por 15 h.

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 4,0 tampão acetato de sódio 5 mM por 15 h de incubação, 200 rpm e 25°C. Neste estudo, 5 diferentes modelos não lineares de isotermas foram ajustados aos dados experimentais 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 (adimensional); 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); β_S é o expoente de Sips (sem dimensão); a_S é a constante modelo de Sips (mL/mg); K_R é a constante isotérmica de Redlich-Peterson (mL/mg); a_R é a constante isotérmica de Redilch-Peterson (1/mg); g é o expoente de Redilch-Peterson (adimensional);

O modelo isotérmico que melhor descreve a adsorção da LTL no suporte Amino-SiO₂ 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; HAMEED, 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^{exp} e q_t^{calc} são os carregamentos experimentais e calculados de proteína em determinados tempos de incubação t , respectivamente, e N é o número de amostras.

3.5.5 Efeito do tempo de contato : Estudos mecânicos

O efeito do tempo de contato na adsorção da LTL foi avaliado quanto às cargas de proteínas iniciais nas quais a saturação de suporte foi observada (20 mg/g). O procedimento de adsorção foi conduzido em pH 4,0 a 25°C e 200 rpm.

3.6 Determinação dos parâmetros de imobilização

A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) com Albumina de Soro Bovina como padrão. Concentração de proteína imobilizada foi determinada (IP – mg/g de suporte) foi calculada segundo a Eq. (7) (LAGE *et al.* 2016; ALVES *et al.* 2017):

$$IP = \frac{V \times (C_0 - C_e)}{m} \quad (7)$$

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 (MIRANDA *et al.* 2014; ALVES *et al.* 2017). 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 mM). 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. Subsequentemente, 10 mL de etanol a 95% m/m foram adicionados

a esta mistura reacional e 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. (8). Uma unidade internacional (UI) de atividade foi definida como sendo a massa de enzima requerida para liberar 1 μmol de ácido graxo livre por minuto de reação. Neste estudo, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$AH \text{ (IU / g)} = \frac{(V_s - V_c) \times M \times 10^3}{t \times m} \quad (8)$$

Em que: AH é a atividade hidrolítica (UI/g biocatalisador); V_s é o volume de solução de NaOH 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. (9) (LAGE *et al.* 2016; ALVES *et al.* 2017):

$$AE = \frac{AH}{PI} \quad (9)$$

Em que: AH é a atividade hidrolítica aparente do biocatalisador preparado (UI/g biocatalisador); PI é a concentração de proteína imobilizada (mg/ g suporte).

A constante de equilíbrio (K_e) de adsorção foi determinada como sendo a relação entre a concentração de proteína imobilizada (PI) e a concentração de proteína residual na solução sobrenadante (C_e) no equilíbrio, de acordo com a Eq. (10):

$$K_e = \frac{PI}{C_e} \quad (10)$$

A energia livre de Gibbs aparente (kJ/mol) foi calculada como mostrado na Eq. (11):

$$\Delta G = - RT \ln K_e \quad (11)$$

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

3.7 Procedimento geral de síntese do biolubrificante oleato de decila

A atividade catalítica do biocatalisador imobilizado em meio orgânico foi determinada na síntese de oleato de decila também por esterificação de ácido oleico e 1-decanol. A reação

foi conduzida em frascos de vidro fechados com capacidade para 100 mL contendo 10 g da mistura reacional incubada em um banho termostatizado com agitação. A reação foi iniciada pela adição de biocatalisador heterogêneo preparado previamente nas condições ótimas de adsorção – carregamento inicial de proteína oferecida de 20 mg/g (IP = 12,3 ± 0,1 mg/g). As amostras foram retiradas da mistura reacional em vários intervalos de tempo (100 µL) para cada sistema de reação, diluídas em 10 mL de solução de álcool (95% m/m) e tituladas com solução de NaOH 30 mM, utilizando fenolftaleína como indicador para determinar a concentração de ácido oleico residual e, conseqüentemente, estimar a porcentagem de conversão (Y), conforme Eq. (12) (MIRANDA *et al.* 2014; LAGE *et al.* 2016; ALVES *et al.* 2017):

$$Y(\%) = \left(\frac{A_0 - A_f}{A_0} \right) \times 100 \quad (12)$$

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

Na Figura 7, mostra um esquema representativo da reação de esterificação catalisada por LTL imobilizada via adsorção iônica em Amino-SiO₂.

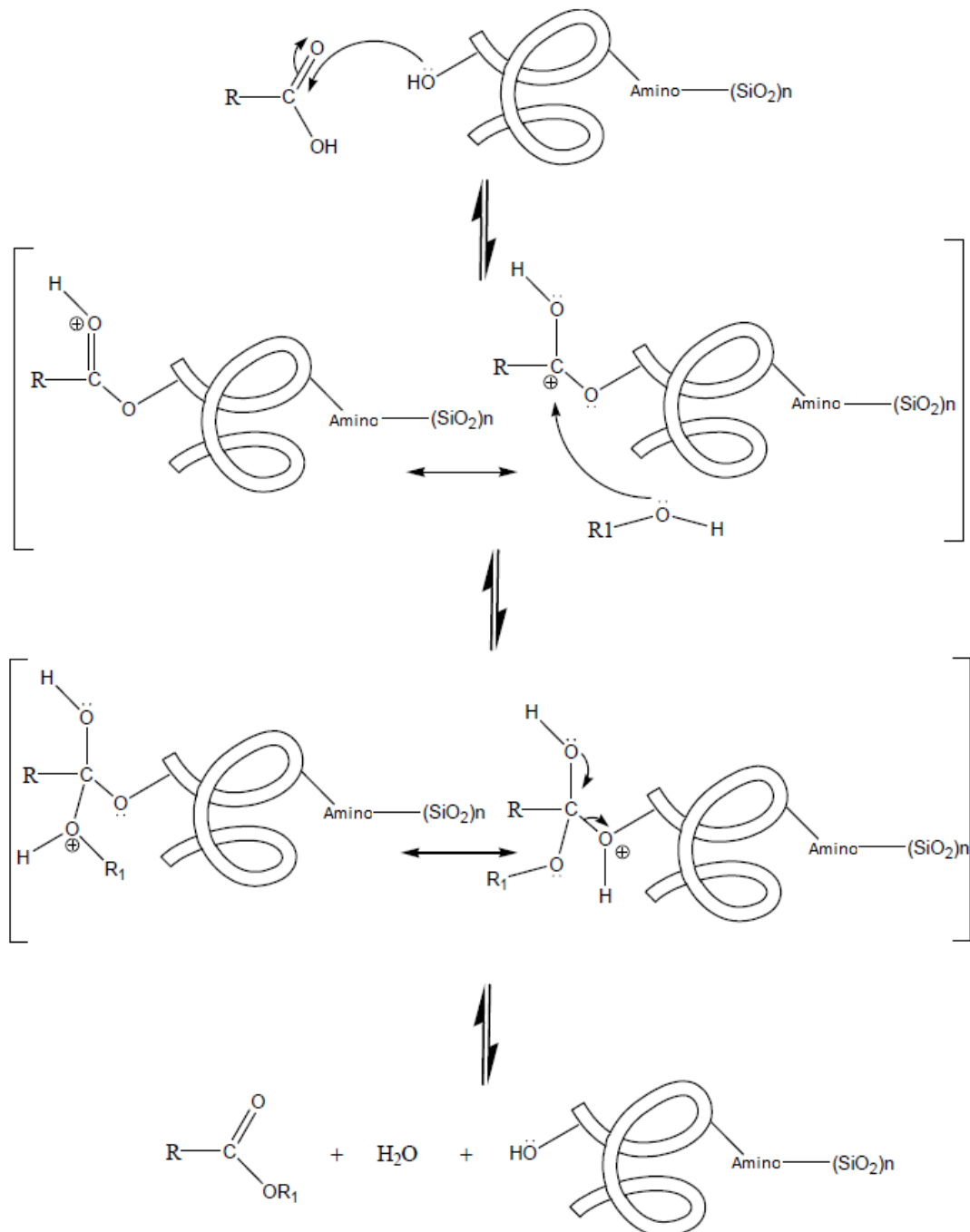


Figura 7 - Esquema representativo da reação de esterificação catalisada por LTL imobilizada em Amino-SiO₂.
Fonte: Do autor.

3.7.1 Efeito dos solventes orgânicos na síntese do éster

Neste estudo, acetona, terc-butanol, ciclohexano, hexano, heptano e iso-octano foram utilizados como solventes orgânicos. Concentrações estequiométricas de ácido oleico e decanol foram diluídas em cada solvente orgânico (concentração final de 1 M para cada reagente) e

incubada com 0,6 g de LTL imobilizada (concentração de biocatalisador de 10% m/v de mistura reacional). As suspensões foram mantidas a 40°C sob contínua agitação (200 rpm) por 5 h.

3.7.2 Efeito da temperatura de reação, concentração de biocatalisador e razão molar ácido:álcool na síntese do éster: Otimização por delineamento central composto rotacional (DCCR)

Um delineamento experimental completo do tipo 2³, consistindo de 18 experimentos nos quais quatro ensaios no ponto central, seis nos pontos axiais e oito ensaios fatoriais foi utilizado para otimizar a síntese de oleato de decila realizada em meio de iso-octano. Os níveis de cada parâmetro foram escolhidos em testes preliminares realizados em nosso laboratório. As reações de esterificação foram realizadas em ordem aleatória, mantendo-se fixa a agitação (200 rpm) e tempo de reação (3 h). Os parâmetros estudados e seus níveis foram temperatura (30 a 70°C), concentração de biocatalisador (5 a 25% m/v) e razão molar de ácido:álcool (1:0,5 a 1:1,5).

A porcentagem de conversão do éster foi considerada como variável resposta. Os resultados experimentais foram analisados ao nível de 95% de confiança, usando o software Statistica versão 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste *t*. O ajuste do modelo foi expresso pelo coeficiente de determinação (R²) e os níveis de significância dos modelos foram verificados por análise de variância (ANOVA). As superfícies de resposta foram plotadas com o intuito de encontrar as condições ótimas de reação.

3.7.3 Efeito da agitação na síntese do éster

O efeito da agitação (0, 50, 100, 150, 200 e 240 rpm) na síntese do éster foi estudado nas condições experimentais ótimas (30°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v, razão molar estequiométrica de ácido:álcool de 1 M de cada reagente em meio de iso-octano). O tempo de reação foi fixado em 3 h de incubação.

3.7.4 Efeito da concentração da peneira molecular na síntese do éster

O efeito da concentração da peneira molecular (0, 5, 10, 15 e 20% m/v de mistura reacional) foi avaliado nas condições experimentais ótimas (30°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v, 150 rpm e razão molar estequiométrica de ácido:álcool de 1 M de cada reagente em meio de iso-octano). As reações foram realizadas por 2 h de incubação.

3.7.5 Efeito do tempo de reação na síntese do éster

O efeito do tempo de reação na síntese do éster também foi estudado nas condições experimentais ótimas (30°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v, 150 rpm, ausência de peneira molecular e razão molar estequiométrica de ácido:álcool de 1 M de cada reagente em meio de iso-octano). Além disso, a síntese de oleato de decila foi também realizada em um sistema isento de solvente orgânico nestas mesmas condições experimentais.

3.7.6 Testes de reuso

Os testes de reuso foram realizados após 8 sucessivos ciclos de reação de 180 min cada, em um sistema isento de solvente orgânico a 30°C, concentração de biocatalisador de 21% m/v, 150 rpm, ausência de peneira molecular e razão molar estequiométrica de ácido:álcool. No final de cada ciclo, o biocatalisador heterogêneo foi removido por filtração, lavado com hexano gelado para remover moléculas de substrato e/ou produtos retidos em seu microambiente e ressuspenso em um novo substrato. A porcentagem de conversão do éster foi determinada ao final de cada ciclo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, SiO_2 foi extraído das cascas do arroz e funcionalizada com 3-APTES para a produção de um suporte (Amino- SiO_2) para ser usado na imobilização de LTL via adsorção iônica. O esquema representativo da funcionalização e adsorção da enzima em Amino- SiO_2 está representado na Figura 8.

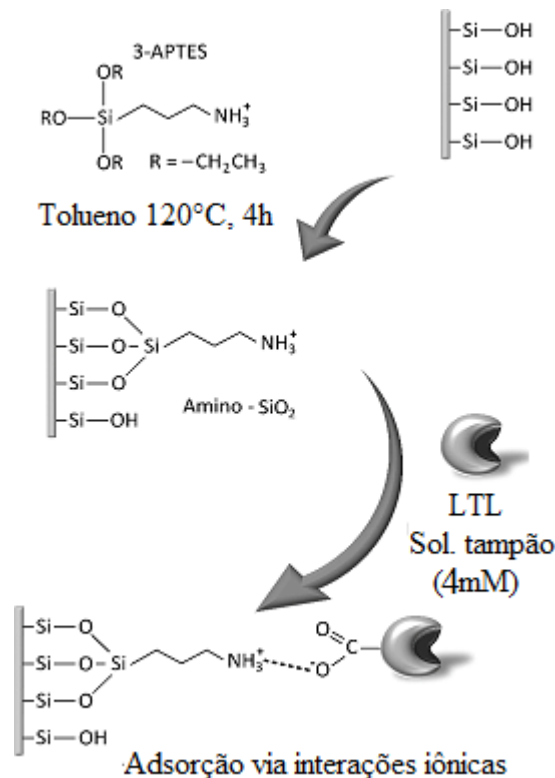


Figura 8 - Esquema representativo da funcionalização da SiO_2 a partir da casca do arroz com 3-APTES e a adsorção física da LTL no suporte.

Fonte: Do autor.

A adsorção da lipase no Amino- SiO_2 procedeu via interação iônica entre grupos amino protonados da superfície de suporte ($-\text{NH}_3^+$) com grupo carboxilato terminal e/ou dos resíduos aspartato e glutamato da superfície da enzima (VESCOVI *et al.* 2017; BERNAL; POVEDA-JARAMILLO; MESA, 2018). A alta densidade de grupos carboxila na superfície de LTL é encontrada na região oposta ao seu sítio ativo (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Deste modo, as moléculas de LTL adsorvidas estão preferencialmente direcionadas para o meio reacional (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; ZHAO *et al.* 2015).

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. Os dados de difração de raio X obtidos para a sílica não funcionalizada e funcionalizada (Amino-SiO₂) estão ilustrados na Figura 9. A sílica obtida demonstrou ser um material amorfo, seu difratograma apresentou características como picos amplos entre 15 e 30° (CUI *et al.* 2017). Após a etapa de funcionalização, não foram encontradas mudanças em sua estrutura amorfa. Similares difratogramas foram reportados em estudos anteriores para partículas de sílica funcionalizada e não-funcionalizada (WANG *et al.* 2011).

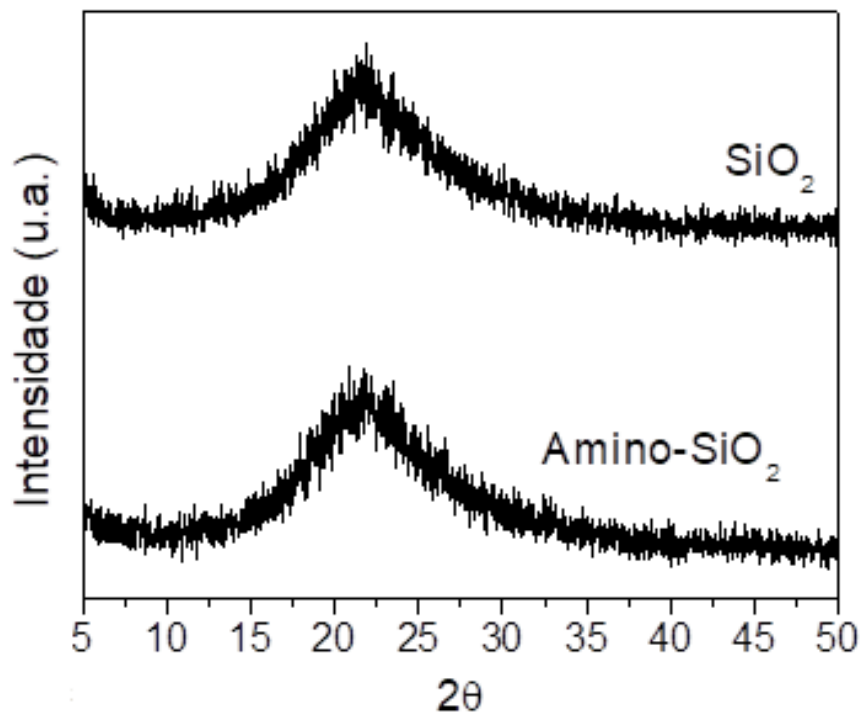


Figura 9 - Difração de raio-X (DRX) de SiO₂ e Amino-SiO₂.

Fonte: Do autor.

Análises de termogravimetria foram realizadas para ambos os suportes (partículas funcionalizada e não-funcionalizada) com intuito de confirmar a introdução das cadeias carbônicas (grupos aminopropil) na superfície do suporte. De acordo com a Figura 10, o suporte não-funcionalizado exibiu alta estabilidade térmica e uma perda de massa de 3% a 900°C é atribuída à condensação dos grupos silanol (-Si-OH) livres para a produção dos grupos siloxano (-Si-O-Si) na superfície do suporte com a liberação de moléculas de água (ASHU-ARRAH; GLENNON, 2017). Por outro lado, foram observados três estágios de perda de massa para o suporte funcionalizado (Amino-SiO₂). O primeiro estágio entre 30 e 120°C é atribuído à perda

de moléculas de água adsorvidas fisicamente na superfície de suporte ($\approx 3,8\%$ em massa), o segundo de 120 a 270°C parece estar associado à remoção de moléculas de água de composição estrutural ($\approx 1,2\%$ em massa) e a terceira (cerca de 8,1% em massa), entre 270 e 900°C é devido à decomposição de grupos aminopropil introduzidos no suporte. A perda final de massa foi de 13,1% em massa. Estes resultados foram confirmados por análise elementar.

De acordo com a Tabela 2, a densidade de grupos funcionais para Amino-SiO₂ foi de 20 μmoles de grupos aminopropil por m² ou 1169 $\mu\text{moles/g}$ de suporte. Esta alta densidade de grupos aminopropil deve-se ao fato de que o volume molecular de 3-APTÉS ser baixo. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados em um estudo anterior usando SiO₂ comercial (VESCOVI *et al.*, 2016).

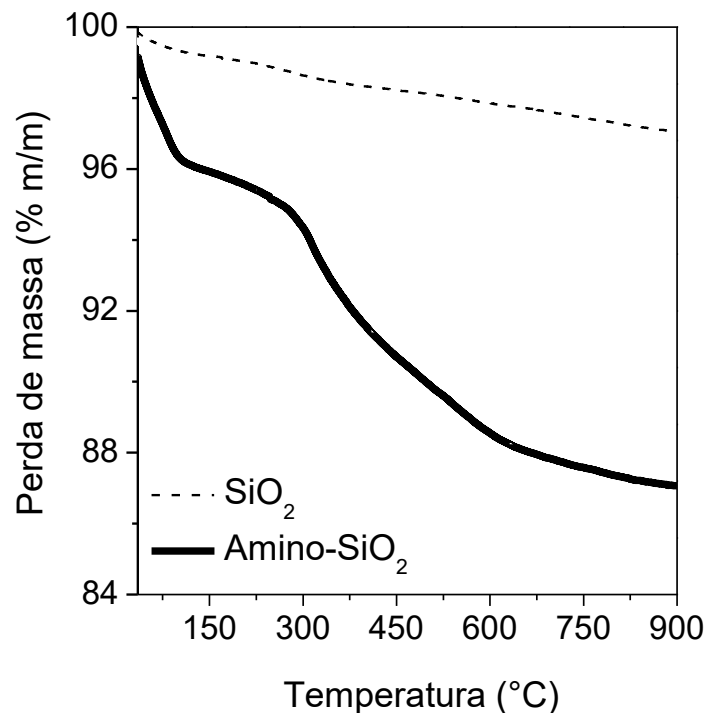


Figura 10 - Análise de termogravimetria (TGA) para SiO₂ e Amino-SiO₂ em atmosfera de ar sintético.
Fonte: Do autor.

Microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica importante para a obtenção topografia superficial (ZDARTA *et al.* 2017). Imagens 3D da topografia da SiO₂ não-funcionalizada e funcionalizada com 3-APTÉS são mostradas na Figura 11. Os parâmetros de rugosidade média (R_m), rugosidade quadrática média (R_{qm}) e altura (Z) foram estimados e sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades de SiO₂ e Amino-SiO₂.

Parâmetros	SiO ₂	Amino-SiO ₂
Distribuição de tamanho de partícula (µm)	78,5–453,1	78,5-453,1
Tamanho médio de partícula (µm)	269,1	269,1
Rugosidade média (nm)	25,5	4,3
Altura media (nm)	8,1	1,2
Área superficial (m ² /g)	222,1	57,7
Volume de poros (cm ³ /g)	0,38	0,15
Diâmetro médio de poros (Å)	36,4	36,0
Densidade de grupos amino (µmoles/g)	0	1169
Densidade de grupos amino (µmoles/m ²)	0	5
Corante RB adsorvido (mg/g)	2,6 ± 0,4	71,7 ± 0,5
Corante RB adsorvido (µg/m ²)	11,6 ± 1,8	1242,4 ± 54,1

Fonte: Do autor.

De acordo com a Figura 11, a sílica não-funcionalizada mostrou maior altura e rugosidade (em termos de R_m e R_qm). 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 3-APTES foi observada. Estes resultados são atribuídos à introdução de novos grupos funcionais (aminopropil) na superfície do suporte que levou à formação de uma superfície mais homogênea, o que foi confirmado pelas análises de MEV E MFA.

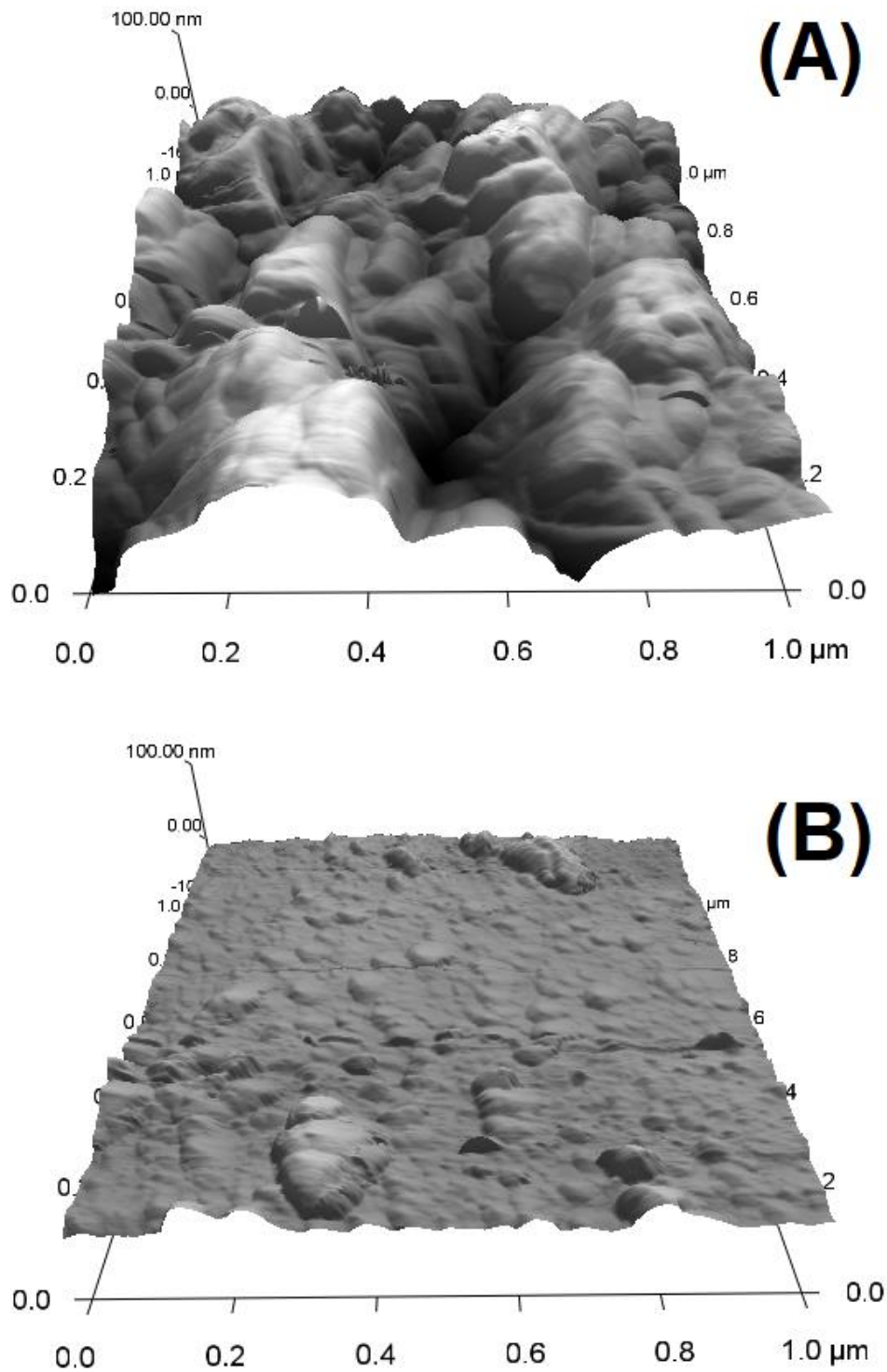


Figura 11 - Imagens tridimensionais de MFA.

Legenda: a) para SiO_2 ;

b) para Amino- SiO_2 .

Fonte: Do autor.

Análises de MEV também foram realizadas para demonstrar o efeito da funcionalização nas propriedades físicas dos suportes preparados (Figura 12). Como pode ser observado, a superfície externa da SiO_2 extraída da casca do arroz é coberta por

pequenas cúpulas irregulares bem alinhadas (aumento de 500 x – Figura 12(A)). Imagens similares de MEV para SiO₂ da casca do arroz foram reportadas em estudos anteriores (WANG *et al.* 2011; KE *et al.* 2016). De acordo com as imagens de MEV com aumento de 20000 x, é possível observar a formação de uma superfície mais homogênea após a etapa de funcionalização com 3-APTES (Figura 12(C)). Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente reportados para MFA (WANG *et al.* 2011; KE *et al.* 2016).

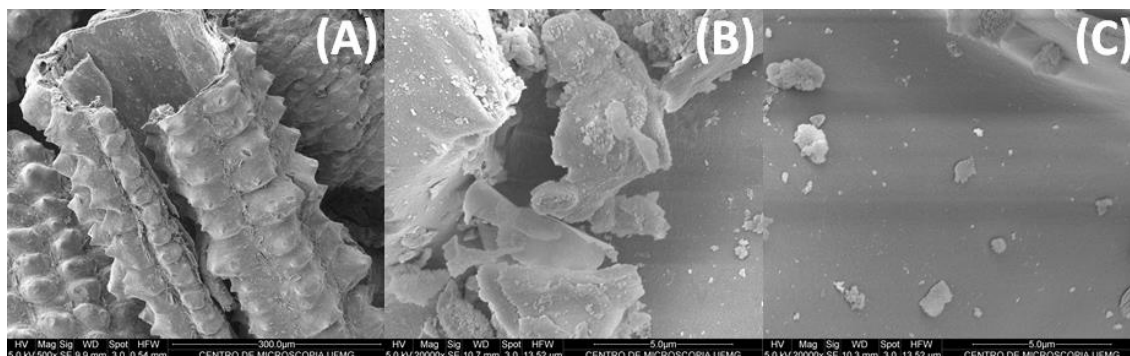


Figura 12 - Imagens de MEV.

- Legenda: a) para SiO₂ magnitude de 500 vezes;
 b) para SiO₂ magnitude de 20000 vezes;
 c) para Amino-SiO₂ magnitude de 20000 vezes.

Fonte: Do autor.

A análise de fisissorção de nitrogênio foi usada para caracterizar a estrutura dos poros de SiO₂ não-funcionalizada e funcionalizada com 3-APTES. Os resultados sumarizados na Tabela 2 mostraram que a área superficial específica das partículas de sílica não funcionalizada é de 222,1 m²/g. Após a etapa de funcionalização, foi observada uma redução da área superficial específica e do volume médio dos poros, como esperado.

De acordo com a classificação da IUPAC, o diâmetro médio de poros entre 2-50 Å é característico de um material mesoporoso, enquanto que tamanho de poro acima de 50 Å é considerado um material macroporoso. O diâmetro médio dos poros do suporte não funcionalizado e funcionalizado foi de 36 Å, mostrando que os suportes preparados são de natureza mesoporosa (Tabela 2). Estes resultados sugerem que a funcionalização do suporte tenha sido preferencialmente realizado na superfície externa da SiO₂ 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), ou seja, 1,5 vezes maior que o diâmetro médio do suporte. Estes resultados mostram que a adsorção da enzima foi preferencialmente na superfície externa do suporte.

A hidrofobicidade de um suporte é uma importante característica a ser utilizada na imobilização de lipases (ZOU *et al.* 2014; ASHU-ARRAH; GLENNON, 2017; LIMA *et al.* 2015). Neste trabalho, a caracterização da hidrofobicidade para SiO₂ não funcionalizada e funcionalizada com 3-APTES foi realizada empregando o método clássico de adsorção do corante Rosa de Bengala (RB) (VESCOVI *et al.* 2016; VESCOVI *et al.* 2017). Os resultados foram expressos em quantidade de massa de corante adsorvida por unidade de área superficial específica (Tabela 2). Como esperado, a funcionalização com 3-APTES aumentou a capacidade do suporte de adsorção do corante RB.

De acordo com os resultados sumarizados na Tabela 2, a maior capacidade de adsorção de corante foi obtida usando Amino-SiO₂, cerca de 107 vezes maior que o SiO₂ não funcionalizado. A interação do corante RB com o suporte ocorreu por meio de interações iônicas com as cargas negativas existentes em sua estrutura química (YING *et al.* 2016; YOSHIMURA *et al.* 2017). Com base nesses resultados, a maior capacidade de adsorção de corante RB usando Amino-SiO₂ pode ser devido à interação iônica intensa entre cargas negativas de corante RB e cargas positivas deste suporte (-NH₃⁺), indicando assim que é um suporte aniônico, como anteriormente ilustrado na Figura 8.

4.2 Efeito da funcionalização de SiO₂ na adsorção de LTL

O efeito da funcionalização das partículas de SiO₂ com 3-APTES (Amino-SiO₂) foi inicialmente avaliado. Neste trabalho, SiO₂ não funcionalizada também foi utilizada como suporte. Os pontos isoelétricos (pI) de SiO₂ da casca do arroz e LTL são em pH 1,0 (PINEDA-VÁSQUEZ *et al.* 2014) e 4,4 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), respectivamente. Nestes experimentos, a adsorção da LTL em sílica não funcionalizada foi realizada em tampão acetato de sódio pH 5,0. Nesta condição, tanto as superfícies do suporte quanto da LTL estão carregadas negativamente e isto pode promover repulsão eletrostática entre as duas estruturas. Isto sugere que a adsorção da enzima na superfície do suporte não funcionalizado seja preferencialmente atribuída às forças de van de Waals e/ou ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxil ou tiol da superfície da enzima (resíduos de tirosina, cisteína e treonina) e os grupos silanos desprotonados. No entanto, algumas interações iônicas entre os grupos amino terminal e/ou amino protonados dos resíduos de lisina (pKa≈10,7) e arginina (pKa≈12,5) e grupos de silanol desprotonados a partir da superfície de SiO₂ também podem ser esperados.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, é possível observar que a funcionalização com 3-APTES permitiu a criação de um microambiente mais favorável para a adsorção da LTL devido à sua maior capacidade de adsorção. 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 5.1, na qual pode ser confirmada com os valores de atividade hidrolítica e específica. Além disso, o processo de adsorção foi mais espontâneo usando o suporte funcionalizado. O suporte funcionalizado foi mais ativo na hidrólise do óleo de oliva porque ele obteve uma concentração de proteína superior da ordem em 47% quando comparado com o suporte não funcionalizado. Estes resultados confirmam a promissora aplicação do suporte funcionalizado na preparação de biocatalisadores imobilizados com alta concentração de proteína imobilizada e alta atividade catalítica. Consequentemente, estudos subsequentes serão realizados utilizando o suporte funcionalizado.

Tabela 3 - Parâmetros de imobilização de LTL em SiO₂ e Amino-SiO₂ (adsorção física em tampão acetato de sódio pH 5,0 com força iônica de 5 mM, 25°C e carregamento inicial de proteína de 5 mg/g de suporte).

Suporte	PI ^a (mg/g)	Ce ^b (mg/g)	AH ^c (UI/g)	AE ^d (UI/mgPI)	Ke ^e	ΔG ^f (kJ/mol)
SiO ₂	3,2 ± 0,2	9,5×10 ⁻²	79,7 ± 5,5	25,0 ± 2,7	33,7	-8,7
Amino-SiO ₂	4,7 ± 0,1	1,1×10 ⁻²	443,7±9,8	92,5 ± 3,3	436,4	-15,1

Legenda: a) – Proteína imobilizada;
 b) – proteína residual no sobrenadante de imobilização no equilíbrio;
 c) – Atividade hidrolítica;
 d) – Atividade específica;
 e) – Constante de equilíbrio;
 f) – Energia de Gibbs.

Fonte: Do autor.

4.3 Efeito do pH na adsorção de LTL

O efeito do pH na preparação de biocatalisadores imobilizados foi avaliado de 3,0 a 9,0, como mostrado na Tabela 4. LTL solúvel foi incubada nestas condições (ensaios controle) e nenhuma diminuição de sua atividade inicial foi observada durante 15 h de incubação (dados não apresentados). Com relação à atividade hidrolítica, observou-se um forte efeito do pH de incubação na imobilização de LTL. Em pH ácido (entre 3,0 a 5,0), LTL foi fortemente

adsorvida na superfície de suporte, mas uma adsorção parcial foi verificada com o aumento de pH nas faixas neutra e alcalina. Além disso, o processo de adsorção foi mais espontâneo entre pH 3,0 e 5,0 – valores de ΔG entre -21 e -14 kJ/mol, respectivamente. Isto é atribuído à possível desprotonação de grupos amino da superfície de suporte com o aumento do pH de incubação, o que gerou repulsão eletrostática entre eles. Trabalhos anteriores mostraram que o ponto isoelétrico de Amino-SiO₂ é de aproximadamente 7,0 (DOBÓ; BERKESI; KUKOVECZ, 2017; ERDEM *et al.* 2011). Assim, são esperadas interações iônicas fortes entre os grupos carboxilato de LTL e os grupos amino protonados da superfície de suporte em pH ácido. A atividade hidrolítica máxima para o biocatalisador preparado com Amino-SiO₂ foi observada em pH 6,0 (549 ± 18 UI/g), seguida de 4,0 (502 ± 9 UI/g) e 3,0 (483 ± 8 UI/g). Estes resultados indicam possíveis limitações difusionais de gotas de óleo entre pH 3,0 e 5,0. Devido à uma maior quantidade de enzimas imobilizadas na superfície do suporte, isso faz com que o substrato não consiga alcançar o sítio catalítico da enzima, apresentando valor mais baixos de atividade que o esperado.

Tabela 4 - Efeito de pH de incubação nos parâmetros de imobilização de LTL em Amino-SiO₂.

pH	PI ^a (mg/g)	Ce ^b (mg/g)	AH ^c (IU/g)	AE ^d (IU/mgPI)	Ke ^e	ΔG^f (kJ/mol)
3,0	≈5,0	1,3×10 ⁻³	483,4 ± 7,9	96,7 ± 1,6	3846,1	-20,5
4,0	≈5,0	1,2×10 ⁻³	502,3 ± 9,0	100,5 ± 1,8	4166,7	-20,7
5,0	4,7 ± 0,1	1,6×10 ⁻²	384,2 ± 27,7	81,8 ± 5,9	293,8	-14,1
6,0	3,2 ± 0,2	9,5×10 ⁻²	548,8 ± 18,0	171,5 ± 5,7	33,7	-8,7
7,0	1,9 ± 0,1	1,6×10 ⁻¹	334,2 ± 4,2	175,8 ± 2,2	11,9	-6,1
8,0	2,0 ± 0,2	1,6×10 ⁻¹	334,2 ± 0	168,8 ± 23,9	12,5	-6,3
9,0	2,7 ± 0,3	1,2×10 ⁻¹	405,7 ± 6,9	150,3 ± 2,6	22,5	-7,7

Legendas: a) – Proteína imobilizada;

b) Proteína residual no sobrenadante de imobilização no equilíbrio;

c) Atividade hidrolítica;

d) Atividade específica;

e) Constante de equilíbrio;

f) Energia de Gibbs.

Fonte: Do autor.

A seleção de um carregamento de proteína apropriado é necessária do ponto de vista industrial de modo a permitir uma alta atividade catalítica por volume do reator e reduzir o tempo necessário para alcançar a conversão desejável (MIRANDA *et al.* 2014). As condições

experimentais presentes que permitiram a máxima concentração de proteína imobilizada foram, então, escolhidas para estudos posteriores. Assim, a adsorção física em pH 4,0 para Amino-SiO₂ foi selecionada devido à sua alta atividade hidrolítica e concentração de proteína imobilizada.

4.4 Efeito da temperatura na adsorção de LTL

O efeito da temperatura de incubação no processo de adsorção e propriedades catalíticas dos biocatalisadores foi estudado no intervalo de 5 a 25°C, com incremento de 5°C. Estes ensaios foram realizados em pH 4,0 (tampão acetato de sódio 5 mM). Nessa faixa de temperatura, LTL solúvel também foi incubada em condições semelhantes e sua atividade original foi mantida após 15 h de incubação (ensaios controle). Nestas condições, não foi observado um efeito relevante da temperatura de incubação nos parâmetros de imobilização, o que mostra a forte afinidade da enzima com o suporte funcionalizado (dados não mostrados). A lipase foi quase totalmente adsorvida neste suporte (5 mg de proteína/g) e os valores de atividade hidrolítica foram semelhantes aos obtidos Amino-SiO₂ em pH 4,0 (440 UI/g de suporte). Neste contexto, testes subsequentes foram realizados a 25°C.

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

O efeito do carregamento inicial de proteína no intervalo de 5 a 30 mg/g do suporte nos parâmetros de imobilização foi estudado com o intuito de determinar a capacidade máxima de adsorção da LTL no suporte funcionalizado. O procedimento de adsorção foi realizado nas condições experimentais previamente estabelecidas (tampão acetato de sódio 5 mM pH 4,0, 25°C e 15 h de incubação). De acordo com os dados sumarizados na Tabela 5, é possível observar um aumento na concentração da proteína imobilizada com o aumento do carregamento inicial de proteína de 5 a 15 mg/g. Carregamentos superiores de proteína não aumentaram a retenção de LTL devido à saturação do suporte (MIRANDA *et al.* 2014; LAGE *et al.* 2016; ALVES *et al.* 2017). 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 (Amino-SiO₂) foi de $12,3 \pm 0,1$ mg/g de suporte.

Tabela 5 - Influência da concentração inicial de proteína nos parâmetros de imobilização de LTL via adsorção física em Amino-SiO₂.

Carregamento de proteína (mg/g)	PI ^a (mg/g)	Ce ^b (mg/g)	AH ^c (IU/g)	AE ^d (IU/mgPI)	Ke ^e	ΔG ^f (kJ/mol)
5	≈5,0	1,2×10 ⁻³	502,3 ± 9,0	100,5 ± 1,8	4166,7	-20,7
10	9,1 ± 0,2	4,7×10 ⁻²	570,9 ± 6,2	62,7 ± 1,8	193,6	-13,0
15	11,5 ± 0,1	1,8×10 ⁻¹	645,8 ± 6,9	56,2 ± 0,9	63,9	-10,3
20	12,3 ± 0,1	4,1×10 ⁻¹	617,4 ± 15,2	50,2 ± 1,5	30,0	-8,4
25	11,9 ± 1,0	6,9×10 ⁻¹	618,6 ± 12,4	51,7 ± 6,1	17,2	-7,1
30	11,6 ± 0,7	9,7×10 ⁻¹	616,7 ± 20,4	53,4 ± 4,2	11,9	-6,1

Legendas: a) Proteína imobilizada,
 b) proteína residual no sobrenadante de imobilização no equilíbrio;
 c) Atividade hidrolítica;
 d) Atividade específica;
 e) Constante de equilíbrio;
 f) Energia de Gibbs.

Fonte: Do autor.

O efeito do carregamento inicial de proteína nas atividades hidrolítica (AH) e específica (AE) dos biocatalisadores preparados é mostrado na Tabela 5. Como pode ser visto, o aumento do carregamento inicial de proteína usando Amino-SiO₂ aumentou cerca de 1,5 vezes - de 444 ± 10 (5 mg/g) para 646 ± 7 UI/g (15 mg/g). O aumento adicional da carga inicial de proteína não promoveu um aumento da atividade hidrolítica. Por outro lado, o valor de atividade específica diminuiu à medida que aumentou a carga inicial de proteína. Estes resultados podem ser atribuídos a um maior número de interações proteína-proteína (por exemplo interações moleculares e intermoleculares) na superfície do biocatalisador, limitando assim o acesso das moléculas do substrato da mistura de reação aos locais ativos da LTL imobilizada (ZAAK *et al.* 2017).

A espontaneidade do processo de adsorção é explicada pela determinação da energia livre de Gibbs aparente (ΔG). De acordo com a Tabela 5, uma redução dos valores de Ke com o aumento da carga de proteína inicial foi observado devido à uma diminuição drástica na área de superfície do suporte disponível para adsorver LTL (saturação de suporte). Os valores de Ke foram então usados para determinar os valores aparentes de ΔG que variaram de -20,7 a -6,1 kJ/mol. Estes valores mostram que a preparação destes biocatalisadores foi um processo espontâneo. De acordo com a literatura especializada, valores aparentes de ΔG variando de 0 a

-20 kJ/mol correspondem a um processo de fisissorção, enquanto que um processo de quimissorção estes valores variam de -80 a -400 kJ/mol (TU *et al.* 2009). Consequentemente, é possível notar que o processo de imobilização da enzima procedeu via interações físicas (processo de fisissorção).

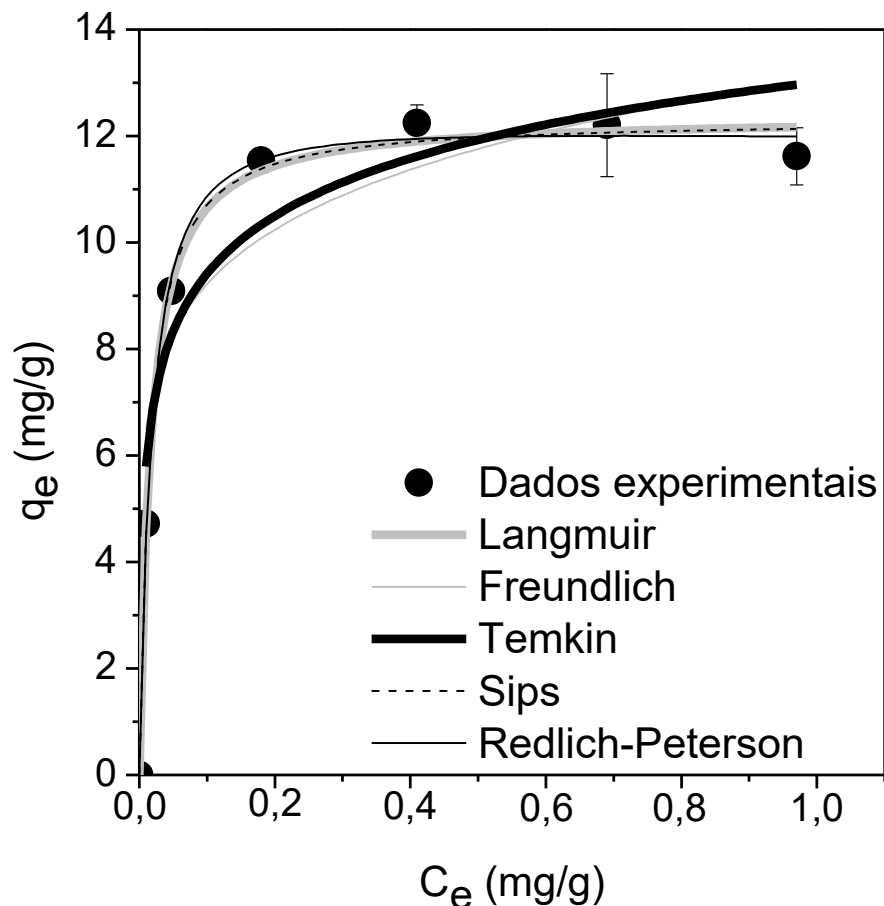


Figura 13 - Ajuste dos modelos não lineares de isoterma aos dados experimentais obtidos para a imobilização de LTL em Amino-SiO₂ empregando diferentes carregamentos de proteína.

Fonte: Do autor.

As 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 uma determinada temperatura (LAGE *et al.* 2016; ALVES *et al.* 2017). Neste estudo, os modelos de isoterma de adsorção de Langmuir, Freundlich, Temkin, Sips e Redlich-Peterson foram ajustados aos dados experimentais obtidos para descrever o processo de adsorção da LTL em Amino-SiO₂ (Figura 13). Os valores dos parâmetros de isoterma, capacidade máxima de adsorção, coeficientes de correlação (R^2) e a média dos erros relativos (MER) são mostrados na Tabela 6. De acordo com os resultados, o modelo de Langmuir foi o que melhor se ajustou aos dados de adsorção de LTL em Amino-SiO₂

como suporte, considerando o maior coeficiente de correlação e as menores médias dos erros relativos (MER). Além disso, os valores da concentração de proteína imobilizada em equilíbrio ($q_e = 12,4$ mg/g de suporte) foi muito semelhante aos dados experimentais - 12,3 mg/g). O modelo de Langmuir assume que a adsorção de moléculas de adsorvato na superfície do adsorvente ocorre 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; HAMEED, 2010).

Tabela 6 - Determinação dos parâmetros de isoterma para a adsorção de LTL em Amino-SiO₂.

Modelo de isoterma	Equação ajustada	Parâmetros	Valores
Langmuir	$q_e = \frac{12,4 \times C_e}{0,016 + C_e}$	q _{max} (mg/g)	12,4
		K _L (mL/mg)	0,016
		R ²	0,9957
		MER	2,97
Freundlich	$q_e = 13,1 \times C_e^{0,15}$	q _e (mg/g) ^a	10,1
		K _F (mg/g)	13,1
		N	0,13
		R ²	0,7486
		MER	13,8
Temkin	$q_e = 1,91 \times \ln(4173,9 \times C_e)$	q _e (mg/g) ^a	12,6
		A _T (mL/mg)	4173,9
		b _T (J/mol)	1297,8
		R ²	0,9491
		MER	25,5
Sips	$q_e = \frac{912,1 \times C_e^{1,04}}{1 + 74,1 \times C_e^{1,04}}$	q _e (mg/g) ^a	11,4
		K _S (mL/mg)	912,1
		β _s	1,04
		a _s	74,1
		R ²	0,9948
		MER	2,70
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{679,1 \times C_e}{1 + 55,6 \times C_e^{1,02}}$	q _e (mg/g) ^a	11,9
		K _R (mL/mg)	679,1
		a _R (1/mg)	1,02
		G	55,6
		R ²	0,9960
		MER	1,57

Legendas: a) valores de q_e determinados com concentração inicial de proteína de 20 mg/g (C_e = 0,41 mg/mL).

Fonte: Do autor.

4.6 Efeito do tempo de contato na adsorção de LTL

O efeito do tempo de contato na concentração de proteína imobilizada no suporte funcionalizado é ilustrado na Figura 14. O processo de adsorção foi melhorado com o aumento do tempo de contato e o equilíbrio foi alcançado após 15 min de incubação.

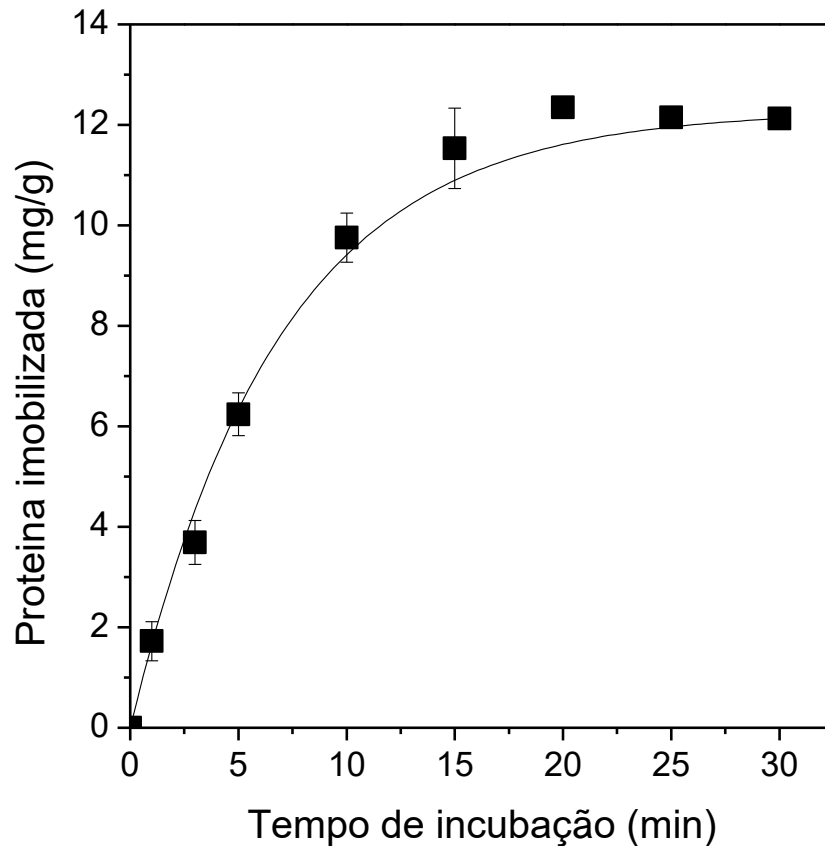


Figura 14 - Efeito do tempo de contato na imobilização de LTL em Amino-SiO₂ empregando carregamento inicial de proteína de 20 mg/g de suporte.

Fonte: Do autor.

4.7 Síntese enzimática do biolubrificante (oleato de decila) por esterificação

O biocatalisador preparado foi usado na síntese de oleato de decila. Neste estudo, o efeito de relevante fatores na produção do éster foi avaliada, como mostrado a seguir.

4.7.1 Efeito de solventes orgânicos na reação

A síntese enzimática de uma variedade de ésteres de interesse industrial é efetuada em meio de solventes orgânicos a fim de aumentar a solubilidade dos reagentes na mistura reacional e torná-los mais acessíveis ao microambiente do biocatalisador. Além disso, a presença de solventes orgânicos como meios de reação pode deslocar o equilíbrio para a síntese de éster (KUMAR *et al.*, 2016). Neste sentido, os solventes orgânicos apolares são os mais utilizados pois a camada essencial de hidratação permanece ligada às estruturas das enzimas, incluindo lipases, preservando sua capacidade catalítica e estabilidade. Por outro lado, a inativação destas enzimas por incubação em solventes polares tem sido bastante documentada (HAZARIKA *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2016; MUSA *et al.*, 2018). O efeito de solventes orgânicos na síntese enzimática do oleato de decila foi investigado. Neste estudo, seis solventes orgânicos com diferentes valores de Log P (logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico de 1-octanol e água), que variam de -0,24 a 4,37, foram utilizados como meio de reação.

Tabela 7 - Efeito do solvente orgânico na síntese do oleato de decila.

Solvente orgânico	Log P	Conversão (%)
Acetona	-0,24	0
<i>terc</i> -butanol	0,58	0
Ciclohexano	3,69	59 ± 1
Hexano	3,76	22 ± 3
Heptano	4,27	63 ± 1
Iso-octano	4,37	70 ± 2

Fonte: Do autor.

De acordo com a Tabela 7, a LTL imobilizada não mostrou atividade catalítica para a síntese do éster conduzida em sistemas de solventes polares (acetona e *terc*-butanol) devido à uma possível remoção da camada essencial de água que estabiliza a estrutura tridimensional da enzima, como mencionado anteriormente. Contudo, em sistemas de reação compostos por solventes apolares, foi obtida uma porcentagem de conversão de éster na ordem de 22 ± 3% a 70 ± 2% após 3 h de reação. A porcentagem máxima de conversão de éster foi observada no meio de reação de iso-octano, o solvente mais hidrofóbico utilizado neste estudo (Log P = 4,37). Esses resultados estão de acordo com os estudos prévios que relatam a elevada produção de ésteres por reações catalisadas por lipase, conduzidas em sistemas de solventes apolares

(HAZARIKA *et al.*, 2002; LIMA; PERES; MENDES, 2018; MUSA *et al.*, 2018). Dessa maneira, iso-octano foi escolhido como o solvente apolar para a síntese enzimática do oleato de decila em estudos subsequentes.

4.7.2 Otimização da síntese de éster por delineamento experimental

Neste ensaio, foi avaliado o efeito da temperatura (30 a 70°C), concentração do biocatalisador (5 a 25% m/v) e razão molar de ácido:álcool (1:0,5 a 1:1,5) na porcentagem de conversão em éster. Estes níveis foram escolhidos considerando os limites de operação do aparato experimental empregado e baseado em testes preliminares realizados em nosso laboratório. Os valores codificados e reais das variáveis independentes e dependente (valores experimentais da porcentagem de conversão do éster) obtidos estão sumarizados na Tabela 8. Como pode ser observado, os valores de conversão variaram de 45% (ensaios nº 10 e nº 18) a 93% (ensaio nº 8) após 3 h de reação. Os valores experimentais foram similares aos preditos pelo modelo, na qual sugere que o modelo empírico pode ser usado para descrever a relação entre as variáveis e a resposta (porcentagem de conversão do éster). Os dados experimentais foram utilizados para estimar os principais efeitos e suas interações na porcentagem de conversão. A análise estatística mostrou que os efeitos da média e os efeitos lineares/quadráticos para as variáveis concentração do biocatalisador e razão molar ácido:álcool foram significativos a um nível de 95% de confiança (Tabela 9).

Tabela 8 - Valores codificados e valores atuais (em parênteses) para o planejamento fatorial completo proposto e porcentagem de conversão de éster obtida na síntese de éster enzimático realizada em meio iso-octano.

Ensaio	Variáveis independentes			Conversão	
	Codificado (atual)			(%)	
	Temperatura (°C)	Biocat. (% m/v)	Ácido:álcool razão molar	Experimental	Previstos
1	-1 (38)	-1 (9)	-1 (1:0,8)	61	62
2	+1 (62)	-1 (9)	-1 (1:0,8)	72	65
3	-1 (38)	+1 (21)	-1 (1:0,8)	72	72
4	+1 (62)	+1 (21)	-1 (1:0,8)	75	66
5	-1 (38)	-1 (9)	+1 (1:1,2)	54	61
6	+1 (62)	-1 (9)	+1 (1:1,2)	68	65
7	-1 (38)	+1 (21)	+1 (1:1,2)	91	95
8	+1 (62)	+1 (21)	+1 (1:1,2)	93	89
9	-1,68 (30)	0 (15)	0 (1:1)	68	60
10	+1,68 (70)	0 (15)	0 (1:1)	45	57
11	0 (50)	-1,68 (5)	0 (1:1)	61	61
12	0 (50)	+1,68 (25)	0 (1:1)	86	90
13	0 (50)	0 (15)	-1,68 (1:0,5)	61	68
14	0 (50)	0 (15)	+1,68 (1:1,5)	90	87
15	0 (50)	0 (15)	0 (1:1)	50	48
16	0 (50)	0 (15)	0 (1:1)	47	48
17	0 (50)	0 (15)	0 (1:1)	50	48
18	0 (50)	0 (15)	0 (1:1)	45	48

Fonte: Do autor.

Tabela 9 - Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de p para síntese enzimática de oleato de decila.

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	p
Média	47,83	±4,10	0,0000 ^a
x_1	-0,63	±2,22	0,7823
x_1^2	3,76	±2,31	0,1420
x_2	8,64	±2,22	0,0046 ^a
x_2^2	9,77	±2,31	0,0028 ^a
x_3	5,47	±2,22	0,0392 ^a
x_3^2	10,48	±2,31	0,0019 ^a
x_1x_2	-2,50	±2,90	0,4147
x_1x_3	0,25	±2,90	0,9336
x_2x_3	6,00	±2,90	0,0728

Legendas: a) parâmetros significativos a 95% do nível de confiança.

Fonte: Do autor.

Notas: x_1 , x_2 , e x_3 representam as variáveis de temperatura, concentração de biocatalisador e razão molar ácido:álcool, respectivamente.

De acordo com a Tabela 10, a ANOVA mostrou que esse modelo foi uma representação adequada da relação efetiva entre a resposta e as variáveis significantes, com um valor de p ($<0,05$) muito pequeno. O valor de R^2 foi de 0,88, o qual foi considerado apropriado, uma vez que o R^2 é superior a 0,80 na qual oferece um modelo adequado aos dados experimentais (SCHIRMANN *et al.*, 2018). O teste F de Fisher também foi significativo porque o valor F calculado para a regressão (6,46) foi quase duas vezes maior do que o valor F tabelado, a um nível de significância de 5% ($F_{0,5; 9; 8} = 3,39$). Isso indica que o modelo matemático é estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre as variáveis dependentes e independentes. Assim, este modelo também pode ser utilizado com sucesso para criar e explorar as superfícies de resposta com o objetivo de encontrar as condições experimentais ótimas que maximizem a síntese de ésteres.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Media quadrática	Teste - F	valores de p
Regression	3924,94	9	436,10	6,46	0,0075
Residual	540,00	8	67,50		
<i>Falta de Ajuste</i>	522,00				
<i>Erro Puro</i>	18,00				
Total	4464,94				
$R^2=0,88$; $F_{0,5;9;8}=3,39$					

Fonte: Do autor.

As superfícies de resposta e de contorno das combinações binárias entre concentração de biocatalisador/temperatura e razão molar de ácido:álcool/temperatura são mostradas nas Figuras 15A e 15B, respectivamente. De acordo com a Figura 15A (combinação binária entre concentração de biocatalisador e temperatura), pode ser observada uma forte correlação entre a concentração do biocatalisador com a porcentagem de conversão. Nota-se que o aumento gradual da porcentagem de conversão foi proporcional ao aumento da concentração do biocatalisador e a maior porcentagem de conversão de éster foi obtida quando o seu nível foi máximo (25% m/v). Evidentemente, isso acontece devido ao aumento do número de sítios ativos disponíveis para catalisar a esterificação no sistema de reação. Por outro lado, nenhum efeito significativo da temperatura reacional na síntese do éster foi observado, mostrando assim que este biocatalisador é altamente ativo na faixa de temperatura avaliada. Além disso, uma excelente difusão dos reagentes ao microambiente do biocatalisador nas condições experimentais testadas foi alcançada. A síntese de éster realizada em uma faixa de temperatura amena é mais interessante porque pode reduzir drasticamente uma possível inativação da enzima após sucessivos ciclos de reação. A interação entre essas duas variáveis também não foi significativa a um nível de 95% de confiança.

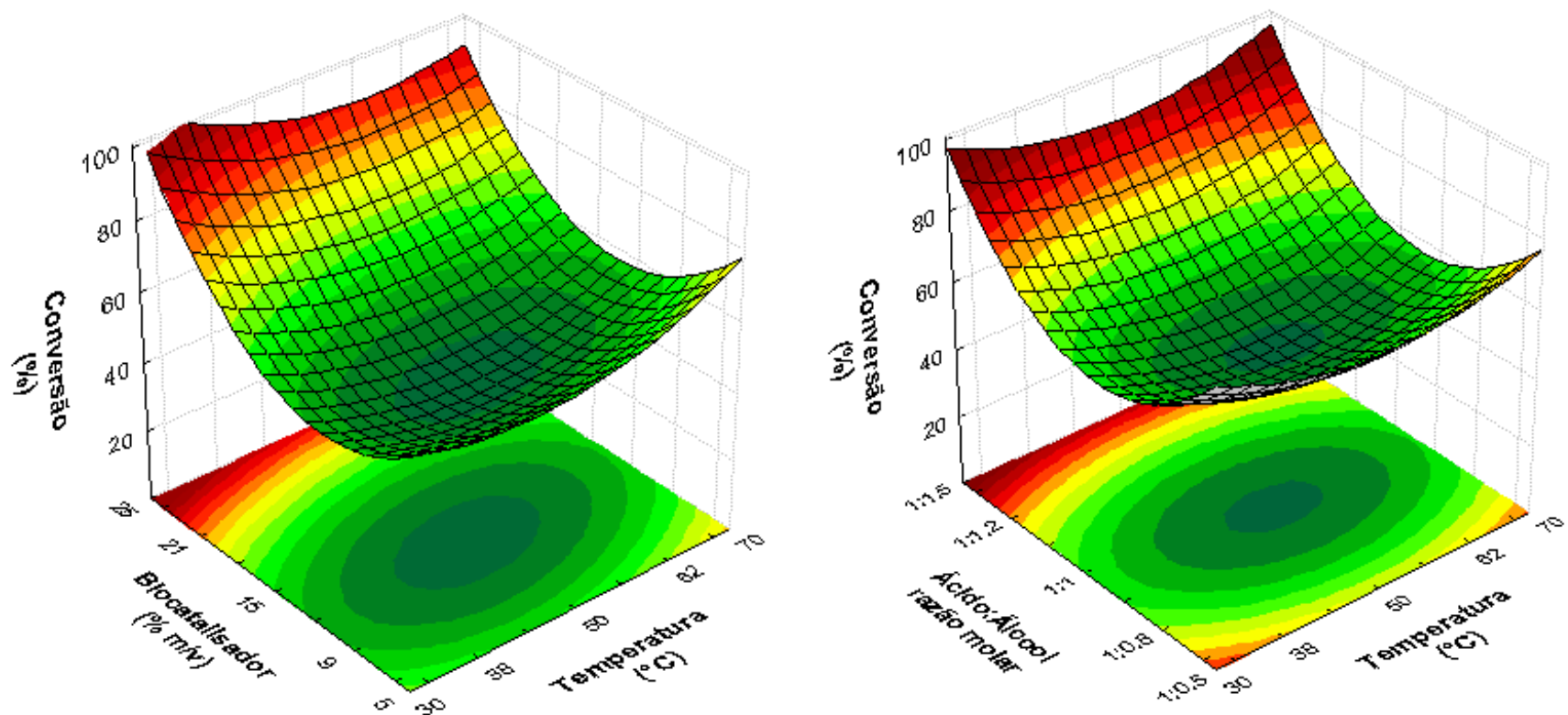


Figura 15 - Superfícies de resposta de acordo com o modelo quadrático predito para a síntese enzimática de oleato de decila. Efeito da temperatura e concentração de biocatalisador (a); e efeito da temperatura e razão molar ácido:álcool (b) na percentagem de conversão em éster.

Fonte: Do autor.

A combinação binária entre razão molar de ácido:álcool e temperatura é mostrada na Figura 15B. Reações de esterificação são processos reversíveis e o excesso de álcool na mistura reacional pode deslocar o equilíbrio para a direção da produção de ésteres (LAGE *et al.*, 2016). Como a concentração de decanol na mistura reacional aumentou de 1:0,5 para 1:1,5, a síntese de éster aumentou gradativamente, como esperado, e constatou-se que a porcentagem máxima de conversão do éster de aproximadamente 90% foi alcançada para uma razão molar de ácido:álcool de 1:1,5. A síntese de éster realizada em excesso de ácido oleico mostrou baixa conversão devido à uma possível inibição da LTL por acidificação de seu microambiente, o que é condizente com estudos anteriores realizados por nosso grupo (MIRANDA *et al.*, 2014; ALVES; CREN; MENDES, 2016). A Figura 15B mostra que a reação pode ser conduzida preferencialmente a uma temperatura amena (entre 30 e 40°C) para se obter alta concentração de éster, conforme reportado acima. A interação entre essas duas variáveis também não foi significativa a um nível de 95% de confiança.

Tabela 11 - Porcentagem experimental de conversão de éster em condições experimentais ótimas.

Ensaio	Variáveis independentes Codificado (atual)			Conversão (%)	
	Temperatura (°C)	Biocat. (% m/v)	Ácido:álcool razão molar	Experimental	Previsto ^a
1	-1,68 (30)	+1,68 (25)	+1.68 (1:1,5)	89	163
2 ^b	-1 (38)	+1 (21)	+1 (1:1,2)	91	95
3	-1,68 (30)	+1 (21)	+1 (1:1,2)	88	104
4	-1,68 (30)	+1 (21)	0 (1:1)	87	82

Legendas: a) valores calculados utilizando os coeficientes de regressão e respectivos valores das variáveis codificadas sumarizados na Tabela 8.

b) Dados experimentais obtidos no ensaio # 7 reportado na Tabela 8.

Fonte: Do autor.

Conforme as Figuras 15A e 15B, as condições experimentais ótimas para a síntese enzimática do oleato de decila foram concentração de biocatalisador de 25% m/v da mistura reacional, razão molar de ácido:álcool de 1:1,5 e temperatura de 30°C. Nestas condições, a porcentagem de conversão máxima de éster foi de 89% após 3 h de reação – experimento nº1

(Tabela 5). Apesar do modelo ser estatisticamente significativo, o valor previsto nesta condição foi quase duas vezes maior (porcentagem de conversão de 163%) que o valor experimental. Os níveis selecionados de cada variável foram limitantes porque as melhores condições experimentais foram encontradas nos níveis mínimo de temperatura (valor codificado = -1,68) e máximos de concentração de biocatalisador e razão molar ácido:álcool (valores codificados = -1,68). Nesses casos, o gráfico de superfície de resposta não é capaz de ilustrar com precisão os resultados nestes níveis. A porcentagem experimental de conversão do éster obtida nas condições otimizadas com base nas Figuras 15A e 15B foram similares aos obtidos no ensaio #7 mostrado na Tabela 8 (porcentagem de conversão de 91% empregando concentração de biocatalisador de 21% m/v, razão molar ácido:álcool de 1:1,2 e 38°C) que na Tabela 11 está representado como “ensaio #2”. Do ponto de vista industrial, esta condição é a mais atraente, pois requer uma menor concentração de biocatalisador e menor excesso de álcool para obter similar porcentagem de conversão. Em um teste subsequente (ensaio #3 – Tabela 11), a síntese de éster foi realizada a 30°C (valor codificado = -1,68), concentração do biocatalisador de 21% m/v (valor codificado = +1) e razão molar ácido:álcool 1:1,2 (valor codificado = +1). Nesta condição, a porcentagem de conversão foi de 88% após 3 h de reação, similar ao resultado obtido anteriormente. Isto confirma que não há efeito significativo da temperatura na síntese do éster, como foi reportado anteriormente nas análises de superfície de resposta (Figuras 15A e 15B). Seguindo essa premissa, foi conduzido um quarto ensaio a 30°C, utilizando a concentração de biocatalisador de 21% m/v e razão molar ácido:álcool 1:1 (valor codificado = 0). A porcentagem de conversão nestas condições foi de 87%, o que é mais interessante economicamente pois não há necessidade da recuperação dos reagentes que se encontram em excesso no fim do processo (FIGUEIREDO; SALIM; BORGES, 2010). Os valores experimental e predito nesta condição foram respectivamente 87 e 82% na qual demonstra boa correspondência entre estes valores. Deste modo, as melhores condições para a síntese do éster foram 30°C, concentração do biocatalisador de 21% m/v e razão molar ácido:álcool de 1:1.

4.7.3 Efeito da agitação na síntese do éster

Amino-SiO₂ é um suporte com tamanho de poro de 36 Å, como mostrado anteriormente (Tabela 2), enquanto as moléculas de LTL tem um diâmetro de 53,3 Å (LAGE *et al.*, 2016). Assim, a imobilização ocorre preferencialmente na superfície externa do suporte, e a agitação pode influenciar fortemente a acessibilidade dos reagentes aos sítios ativos de LTL imobilizada

na superfície externa do suporte. De acordo com os resultados mostrados na Figura 16, o aumento da agitação de 0 a 150 rpm aumentou a conversão percentual em éster de 70 a 88%. Isto deve-se à redução da espessura da película estagnada em torno da superfície externa do biocatalisador que diminuiu a resistência à transferência de massa na interface sólido-líquido, melhorando assim o acesso das moléculas dos reagentes ao microambiente do biocatalisador. No entanto, o aumento adicional na velocidade de agitação não melhorou a síntese do éster. Assim, testes subsequentes foram realizados a 150 rpm.

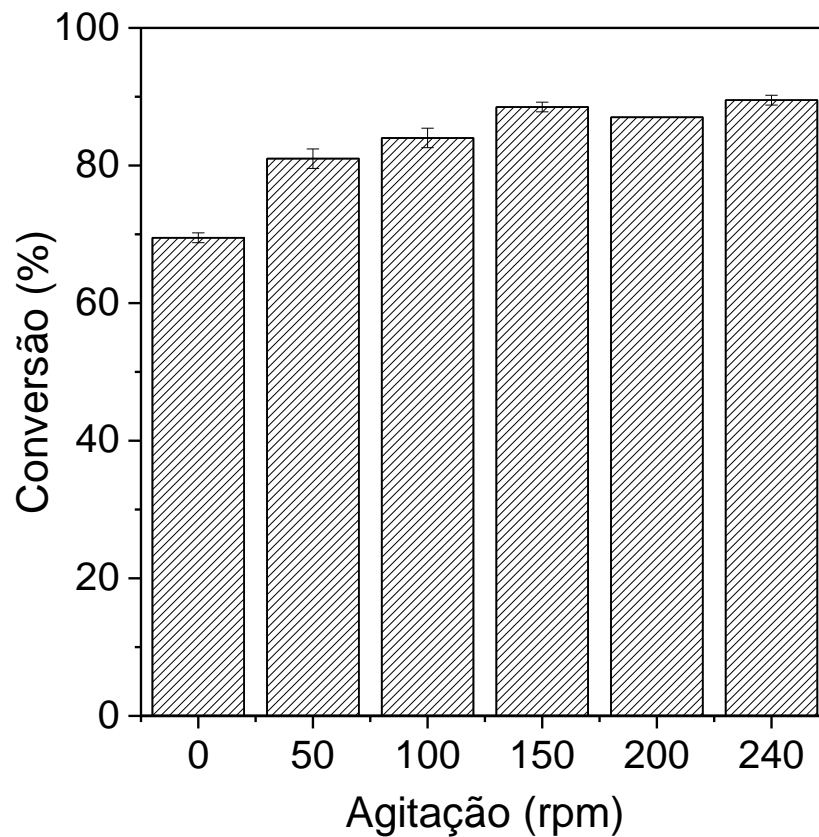


Figura 16 - Efeito da agitação na porcentagem de conversão. As reações foram realizadas a 30°C, razão molar ácido:álcool 1:1 e 21% m/v de catalisador.

Fonte: Do autor.

4.7.4 Efeito da concentração da peneira molecular na síntese do éster

Em reações de esterificação, a concentração de água no sistema afeta a conversão e a posição do equilíbrio da reação. Sendo assim, é importante adotar métodos de controle da concentração de água no meio reacional. A utilização de peneira molecular, importante classe de zeólitas sintéticas utilizadas em catálise e adsorção, é importante para remover moléculas de água geradas durante a reação de esterificação, conseqüentemente deslocando o equilíbrio da

reação para a formação de produto (SONG; WEI, 2002; CUI *et al.*, 2016; TODERO *et al.*, 2015). O efeito da concentração da peneira molecular na faixa de 0 a 20% m/v na síntese do oleato de decila foi testado. De acordo com a Figura 17, nenhuma influência da concentração da peneira molecular foi observada. Nessa faixa de concentração (0-20% m/v), foi obtida a porcentagem de conversão de éster de 88% em 2 h de reação. Estes resultados sugerem que as moléculas de água geradas durante a reação foram adsorvidas na superfície do biocatalisador para manter a estrutura 3D ativa da enzima (MIRANDA *et al.*, 2014). Sendo assim, peneiras moleculares não foram utilizadas em testes subsequentes.

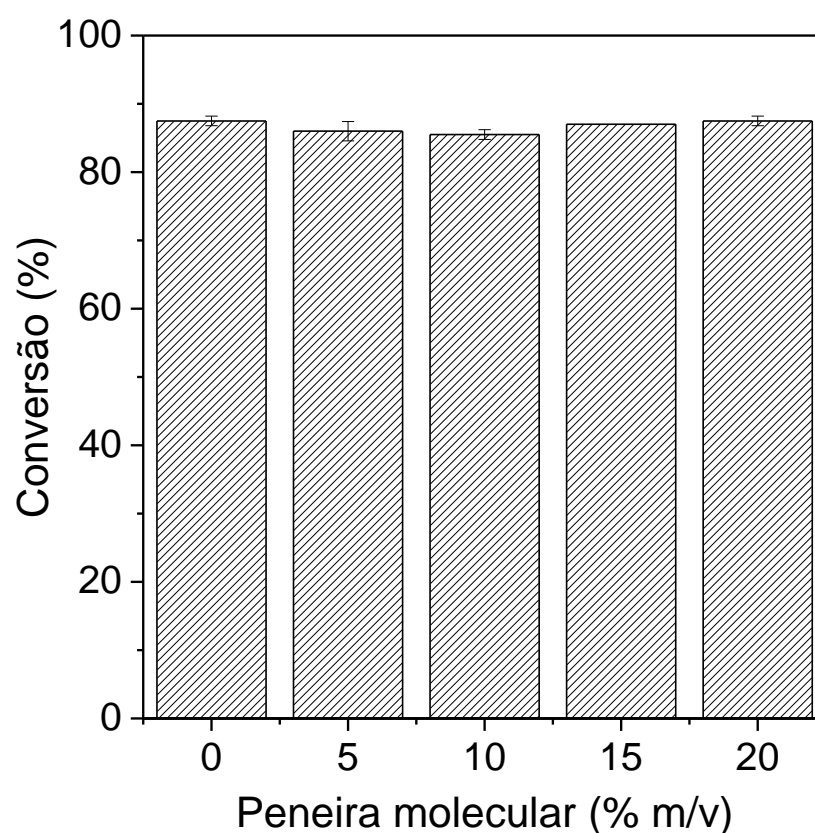


Figura 17 - Efeito da concentração de peneira molecular na porcentagem de conversão. As reações foram realizadas a 30°C, razão molar ácido:álcool 1:1, concentração de biocatalisador de 21% m/v e agitação de 150 rpm.

Fonte: Do autor.

4.7.5 Efeito do tempo de reação na síntese do éster: Comparação entre a síntese de éster em sistemas na presença e na ausência de solvente orgânico

Neste estudo, o efeito do tempo de reação na síntese do éster foi realizada nas condições otimizadas do sistema (30°C, concentração do biocatalisador 21% m/v, razão molar

ácido:álcool 1:1, 150 rpm e ausência de peneira molecular). Baseado nos resultados apresentados na Figura 18, a porcentagem de éster em meio de iso-octano foi de 88% em 105 min de reação e após esse período a reação atingiu o equilíbrio. Nestas mesmas condições, a síntese do éster em um sistema isento de solvente obteve similar porcentagem de conversão (87%) para 180 min de incubação. Os resultados mostram que o uso de um solvente hidrofóbico como meio reacional reduziu a viscosidade do meio de reação na qual melhora a difusão destes compostos para os sítios ativos da LTL imobilizada (ALVES; CREN; MENDES *et al.*, 2016; LIMA; PERES; MENDES, 2018).

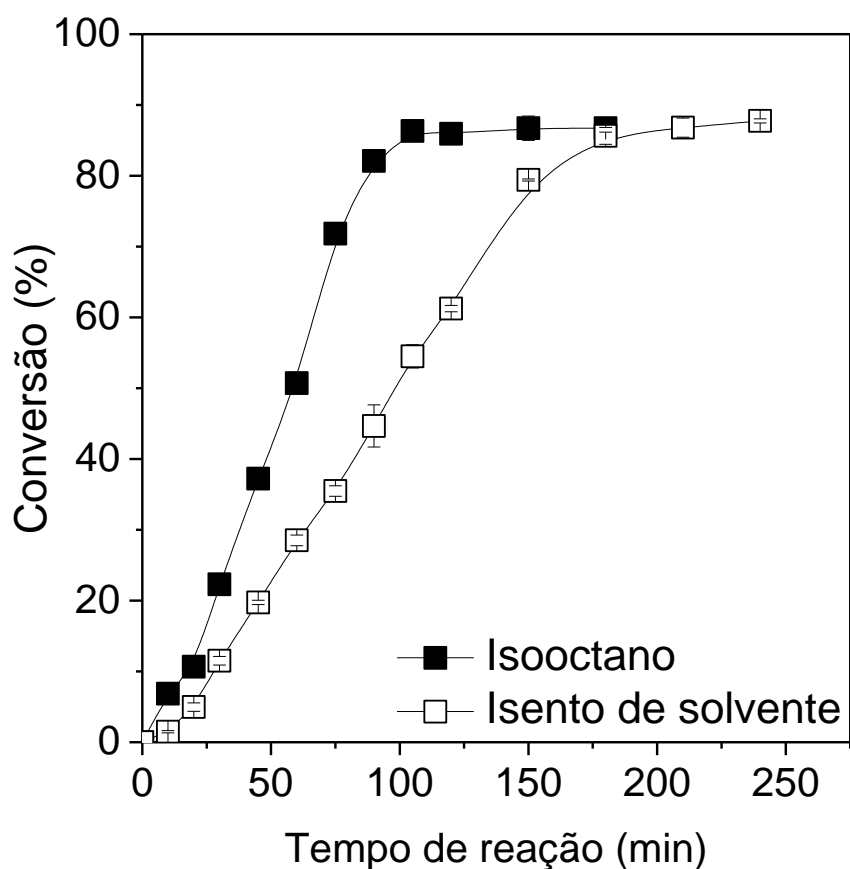


Figura 18 - Efeito do tempo de reação na porcentagem de conversão para a síntese de oleato de decila realizada em meio de iso-octano e em meio isento de solvente. As reações foram realizadas a 30°C, razão molar ácido:álcool 1:1, concentração de biocatalisador de 21% m/v, ausência de peneira molecular e agitação de 150 rpm.

Fonte: Do autor.

As velocidades iniciais para a reação conduzida em meio de iso-octano e isento de solvente foram calculadas a partir da inclinação da curva de consumo de ácido oleico por tempo de reação (Figura 19). Como pode ser observado, os valores de velocidades iniciais da reação foram da ordem de 10 mM / min para ambos os sistemas de reação. Isso indica que a síntese enzimática do éster em um sistema isento de solvente pode ser uma estratégia promissora em

processos industriais, pois os solventes orgânicos são altamente tóxicos à saúde humana e ao meio ambiente e necessitam de uma etapa e pós-tratamento para sua recuperação e separação de produtos (LEE *et al.*, 2010; BASSI *et al.*, 2016). Assim, a síntese de éster realizada em sistema isento de solventes ajudam a superar tais limitações. Testes de estabilidade operacional do biocatalisador (reuso) foi realizado em meio isento de solvente.

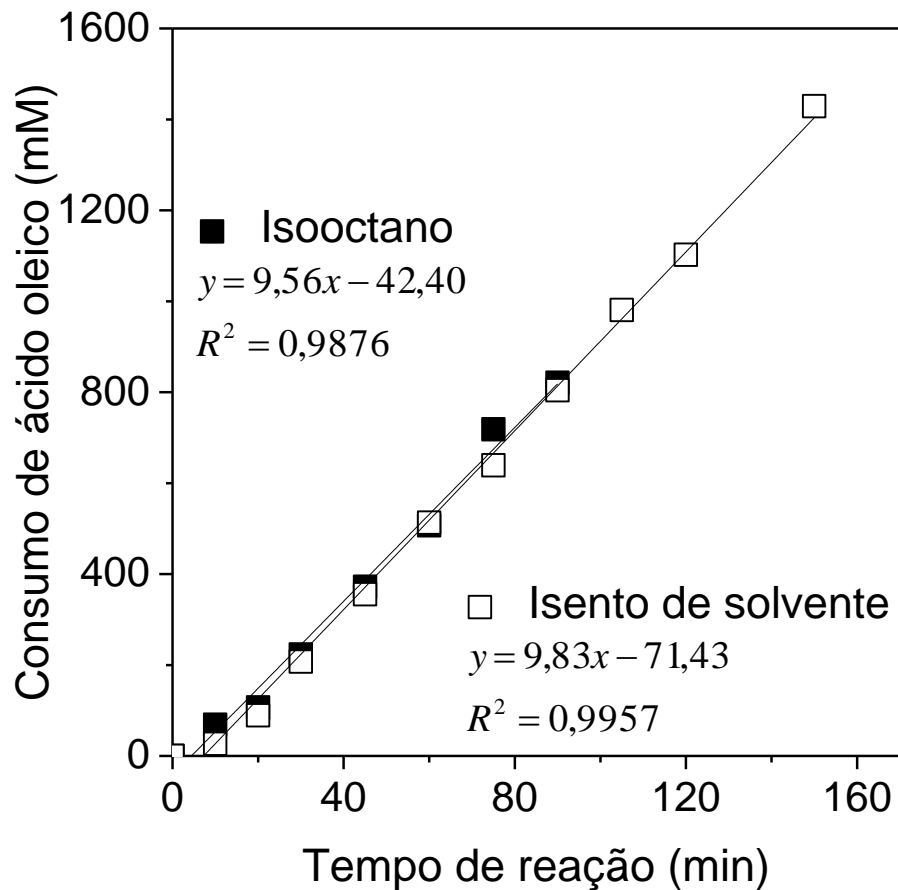


Figura 19 - Determinação das velocidades iniciais na síntese de oleato de decila realizada em meio de iso-octano e em meio isento de solvente. As reações foram realizadas a 30°C, razão molar ácido:álcool 1:1, concentração de biocatalisador de 21% m/v, ausência de peneira molecular e agitação de 150 rpm.

Fonte: Do autor.

4.7.6 Ensaios de estabilidade operacional do biocatalisador

A reutilização de biocatalisadores heterogêneos é um dos fatores nos processos industriais. Neste estudo, os ensaios de reutilização foram realizados nas condições experimentais ótimas após 8 sucessivos ciclos de reação de 180 min cada em um sistema isento de solvente. De acordo com os resultados apresentados na Figura 20, o biocatalisador manteve sua atividade original após oito ciclos. Isto deve-se a intensa interação das moléculas de LTL com a superfície do suporte que reduziu sua possível dessorção e auxiliou em sua estabilização. Além disso, a eliminação correta dos reagentes residuais e/ou produtos adsorvidos na superfície do biocatalisador durante as etapas de lavagem também reduziram possível distorção da enzima (LAGE *et al.*, 2016; LIMA; PERES; MENDES, 2018).

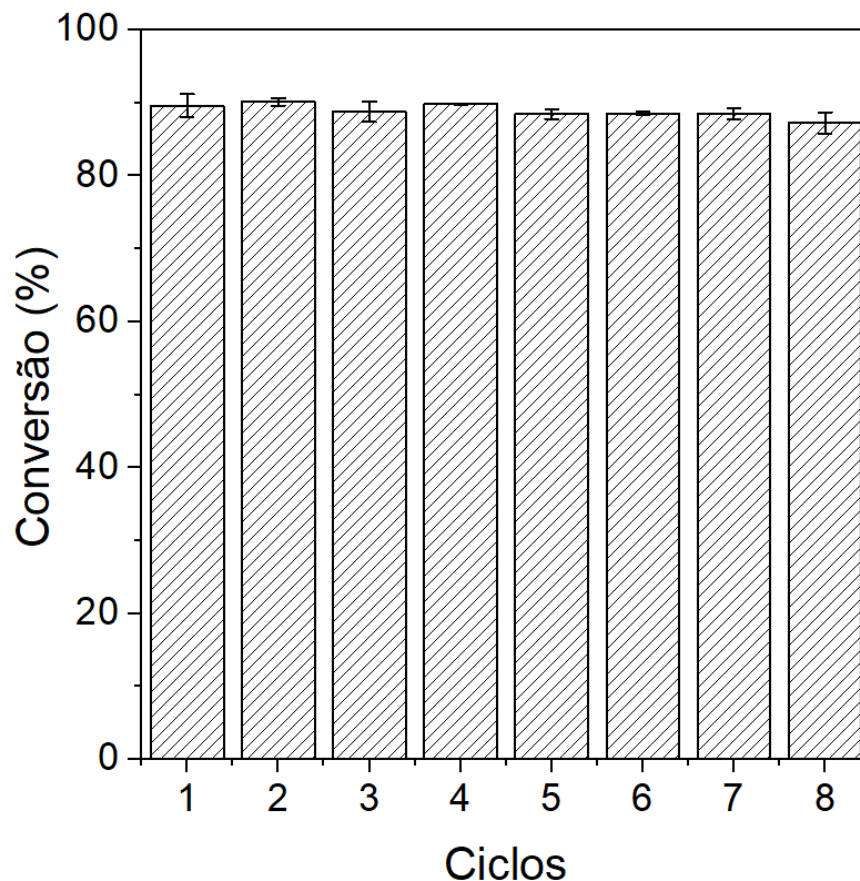


Figura 20 - Estabilidade operacional do biocatalisador após sucessivos ciclos de síntese de oleato de decila em meio isento de solvente. As reações foram realizadas a 30°C, razão molar ácido:álcool 1:1, concentração de biocatalisador de 21% m/v, ausência de peneira molecular e agitação de 150 rpm.

Fonte: Do autor.

5 CONCLUSÃO

Partículas de SiO₂ foram preparadas com sucesso a partir do tratamento hidrotérmico de casca de arroz, um resíduo agroindustrial comumente encontrado no Brasil, e funcionalizadas com 3-APTES para serem utilizadas na imobilização de LTL via adsorção iônica. 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. O biocatalisador preparado foi empregado na síntese de oleato de decila (biolubrificante) por esterificação direta de ácido oleico e decanol. O efeito de relevante fatores na síntese do éster foi avaliado e máxima porcentagem de conversão da ordem de 87% foi observado a 30°C, 150 rpm, 21% m/v de biocatalisador e com razão molar ácido:álcool de 1:1 e sem adição de peneira molecular. O biocatalisador preparado foi altamente ativo após 8 consecutivos ciclos de reação de esterificação em meio isento de solvente. De acordo com os resultados obtidos, é possível observar a promissora aplicação do suporte preparado na adsorção de LTL para ser usado como biocatalisador em reações de grande interesse industrial como hidrólise de óleo vegetal e síntese de biolubrificante. Além disso, o suporte preparado 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

Com base nos resultados deste trabalho sugerimos então:

- 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 decílicos empregando ácidos graxos provenientes de óleos vegetais e/ou gorduras animais.

REFERÊNCIAS

ACME-HARDESTY CO. Renewable, sustainable, bio-based products manufacturers can count on. 2018. Disponível em: <<https://www.acme-hardesty.com/product/decyl-oleate/>> Acesso em: 24 jun 18.

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

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

ÅKERMAN, C. O. et al. Biolubricant synthesis using immobilized lipase: Process optimization of trimethylolpropane oleate production. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2225-2231, 2011a.

_____. Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 263-269, 2011b.

AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilisation: An equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 207-215, 2000.

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, 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. 377-387, 2016.

AOUF, C. et al. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. **Green Chemistry**, v. 16, p. 1740-1754, 2014.

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

AULAKH, S.S.; SHARMA, A.; PRAKASH, N.T.; PRAKASH, R. Biocatalyzed esterification of oleic acid using cell suspension and dried biomass of *Aspergillus* sp. RBD01. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, p. 127-130, 2017.

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.

BERNAL, C. et al. Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts. **Food Chemistry**, v. 239, p. 189-195, 2018.

BERNAL, C.; POVEDA-JARAMILLO, J. C.; MESA, M. Raising the enzymatic performance of lipase and protease in the synthesis of sugar fatty acid esters, by combined ionic exchange –hydrophobic immobilization process on aminopropyl silica support. **Chemical Engineering Journal**, v. 34, p. 760–767, 2018.

BHIMA, A. N. et al. Simultaneous utilization of soju industrial waste for silica production and its residue ash as effective cationic dye adsorbent. **E-polymers**, v. 15, n. 6, p. 427-437, 2015.

BONDIOLI, P. The preparation of fatty acid esters by means of catalytic reactions. **Topics in Catalysis**, v. 27, n. 1-4, p. 77-82, 2004.

BRADFORD, M. M. 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, n. 2, p. 287-297, 2014.

CALVALCANTE, P. M. M. et al. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, p. 319-329, 2015.

CHANG, R.C.; CHOU, S.J.; SHAW, J.F. Synthesis of fatty acid esters by recombinant *Staphylococcus epidermidis* lipases in aqueous environment. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2619-2622, 2001.

CHEN, GC. et al. Activity enhancement and stabilization of lipase from *Pseudomonas cepacia* in polyallylamine-mediated biomimetic silica. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 525–529, 2011.

COMAN, S. M.; PARVULESCU, V. I. Heterogeneous catalysis for biodiesel production. In: TRIANTAFYLLIDIS, K.; LAPPAS, A.; STÖCKER, M. **The Role of Catalysis for the Sustainable Production of Bio-fuels and Bio-chemicals**. Elsevier, 2013. cap. 4, p. 93-136.

CUI, S. et al. Preparation of amine-modified SiO₂ aerogel from rice husk ash for CO₂ adsorption. **Journal of Porous Materials**, v. 24, p. 455-461, 2017.

_____. Synthesis of biosafe isosorbide dicaprylate ester plasticizer by lipase in a solvent-free system and its sub-chronic toxicity in mice. **RSC Advances**, v. 6, p. 11959–11966, 2016.

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.

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

ERDEM, A. et al. Synthesis of aminopropyl triethoxysilane-functionalized silica and its application in speciation studies of vanadium(IV) and vanadium(V). **Chemical Engineering Journal**, v. 174, p. 76–85, 2011.

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.

FERRAZ, L. I. R. et al. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 44-48, 2015.

FIGUEIREDO, K.C.S., SALIM, V.M.M., BORGES, C.P. Ethyl oleate production by means of pervaporation-assisted esterification using heterogeneous catalysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 609–617, 2010

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 1, p. 2-10, 2010.

GABRIEL, L. F. et al. Uma análise da indústria automobilística no Brasil e a demanda de veículos automotores: algumas evidências para o período recente. In: ENCONTRO NACIONAL DE ECONOMIA, 39. 2011, Foz do Iguaçu. **Anais do 39º Encontro Nacional de Economia**, Foz do Iguaçu: ANPEC-Associação Nacional dos Centros de Pós-Graduação em Economia, 2011.

GNANASEKARAN, D.; CHAVIDI, V. P. Biodegradable, renewable, and eco-friendly vegetable oil: lubricants. In: GNANASEKARAN, D.; CHAVIDI, V. P. **Vegetable oil based bio-lubricants and transformer fluids: applications in power plants**. Singapura: Springer, 2018. cap. 2, p. 29-47.

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, E. Enzyme immobilisation: fundamentals and application. **Chemical Society Reviews**, n. 42, p. 6211, 2013.

HARTMANN, T.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas – Benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, n. 15, p. 1-13, 2013.

HAZARIKA, S. et al. Ethyl oleate synthesis by porcine pancreatic lipase in organic solvents. **Chemical Engineering Journal**, v. 85, p. 61–68, 2002.

HILLS, G., 2003. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology** v. 105, p. 601–607, 2003.

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

JITPUTTI, J. et al. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. **Chemical Engineering Journal**, v. 116, p. 61-66, 2006.

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

KERN, S. et al. Process characterization studies for solvent-free simultaneous epoxidation and transesterification of fatty acid methyl esters. **Organic Process Research e Development**, v. 20, n. 11, p. 1930-1936, 2016.

KLEIN, M. P. et al. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1375-1379, 2011.

KUMAR, A. et al. 2016. Lipases catalysis in organic solvents: Advantages and applications. **Biological Procedures Online** v. 18, 2, 2016

KUO, C. H. et al. High yield of wax ester synthesized from cetyl alcohol and octanoic acid by Lipozyme RM-IM and Novozym 435. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11694–11704, 2012.

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.

LEE, A. et al. Optimized enzymatic synthesis of levulinate ester in solvent-free system. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 246– 251, 2010.

LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & 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**, v. 41, p. 991–1002. 2018

LÓPEZ, B. C. et al. Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 706-711, 2014.

MACHADO, G. D. et al. Computer simulation of biodiesel production by hydro-esterification. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 103, p. 37-45, 2016.

MANG, T.; GOSALIA, A. Lubricants and their market. In: DRESEL, W.; MANG, T. **Lubricants and Lubrication**, WileyVch, 2017. cap. 1, p. 1-9.

MENEZES, P. L. et al. Friction and wear In: MENEZES, P. L. et al. **Tribology for scientists and engineers: from basics to advanced concepts**. New York: Springer Science & Business Media, 2013. cap. 2, p. 43-91.

MENEZES, P. L. Green lubricants: role of additive size. In: NOSONOVSKY, M.; BHUSHAN, B. **Green tribology – biomimetics, energy conservation and sustainability**. New York: Springer Verlag NY, 2012. cap. 10, p. 265-286.

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.

MOBARAK, H. M. et al. The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 34-43, 2014.

MUSA, N. et al. Immobilization of an Antarctic *Pseudomonas* AMS8 lipase for low temperature ethyl hexanoate synthesis. **Catalysts**, v. 8, 2018.

NAGENDRAMMA, P.; KAUL, S. Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 764-774, 2012.

NARWAL, S. K. et al. Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 69–73, 2016.

PANCHAL, T. M. et al. A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 70, p. 65-70, 2017.

PAPADAKI, A. et al. Production of wax esters via microbial oil synthesis from food industry waste and by-product streams. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 274-282, 2017.

PINEDA-VÁSQUEZ, T. G. et al. Biogenesis of silica nanoparticles from rice husk ash using *Fusarium oxysporum* in two different growth media. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 6959–6965, 2014.

RANI, K.N.P. et al. Kinetics of enzymatic esterification of oleic acid and decanol for wax ester and evaluation of its physico-chemical properties. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** v. 55, p. 12–16, 2015.

REEVES, C. J.; SIDDAIAH, A.; MENEZES, P. L. A Review on the science and technology of natural and synthetic biolubricants. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 3, n. 11, p. 1-27, 2017.

SÁ, A. G. A. et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceutical industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.

SABOYA, R. M. A. et al. Synthesis of biolubricants by the esterification of free fatty acids from castor oil with branched alcohols using cationic exchange resins as catalysts. **Industrial Crops and Products**, v. 104, p. 52-61, 2017.

SALIH, N.; SALIMON, J.; YOUSIF, E. The physicochemical and tribological properties of oleic acid based trimeric biolubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1089-1096, 2011.

SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 519-530, 2010.

SCHIRMANN, J.G. et al. Selective control for the laccase-catalyzed synthesis of dimers from 2,6-dimethoxyphenol: Optimization of 3,3',5,5'-tetramethoxy-biphenyl-4,4'-diol synthesis using factorial design, and evaluation of its antioxidant action in biodiesel. **Applied Catalysis A: General**, v. 555, p. 88–97, 2018.

SCHNEIDER, M. P. Plant-oil-based lubricants and hydraulic fluids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1769-1780, 2006.

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

SHELDON, R. A.; PELT, S van. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, n. 42, p. 6223-6235, 2013.

SHINDE, S. D.; YADAV, G. D. Microwave irradiated immobilized lipase catalyzed synthesis of alkyl benzoate esters by transesterification: Mechanism and kinetic modeling. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 8706-8713, 2014.

SILVA, J. A. C. et al. Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 323-329, 2015.

SILVA, R. V.; BRITO, J.; DHIR, R. K. Properties and composition of recycled aggregates from construction and demolition waste suitable for concrete production. **Construction and Building Materials**, v. 65, p. 201-217, 2014.

SONG, Q.X., WEI, D.Z. Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, p. 261–266, 2002.

SÖRENSEN, M. H. et al. Improved enzymatic activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in a hydrophobic particulate mesoporous carrier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, p. 359–365, 2010.

STATISTA, The Statistic Portal (2018a). Total global supply of rice from 2000/2001 to 2017/2018 (in million metric tons). Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/256005/global-rice-supply-since-2000/>> Acesso em 10 jul. 2018.

STATISTA, The Statistic Portal (2018b). Quantity of rice produced in Brazil from 2010 to 2017 (in million metric tons). Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/741138/rice-production-volume-brazil/>> Acesso em 10 jul. 2018.

STEPANKOVA, V. et al. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, p. 2823-2836, 2013.

SYAIMA, M. T. S. et al. The synthesis of bio-lubricant based oil by hydrolysis and non-catalytic of palm oil mill effluent (POME) using lipase. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 669-675, 2015.

TODERO, L.M. et al. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: Optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1601–1613, 2015

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Global biolubricants market is expected to reach usd. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/global-biolubricants-market-is-expected-to-reach-usd-23775-million-in-2018-transparency-market-research-183136911.html>>. Acesso em: 19 dez. 17.

TRUTH IN AGING. The honest truth about beauty & personal care products. Disponível em: <<https://www.truthinaging.com/ingredients/decyl-oleate>> Acesso em: 24 jun. 18.

TU, M.; PAN, X.; SADLER, J. S. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignina from Lodgepole Pine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7771–7778, 2009.

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.

VENDITTI, I. et al. *Candida rugosa* lipase immobilization on hydrophilic charged gold nanoparticles as promising biocatalysts: Activity and stability investigations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 131, p. 93-101, 2015.

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.

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.

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

WU, SC.; LIA, YK. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 103-108, 2008.

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.

YOSHIMURA, T. et al. In situ photocurrent spectra measurements during growth of three-dye-stacked structures by the liquid-phase molecular layer deposition. **Journal of Applied Physics**, v. 122, 2017.

ZAAK, H. et al. Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 117–123, 2017.

ZAINAL, N. A. et al. A review on the chemistry, production, and technological potential of biobased lubricants. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 80-102, 2018.

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

ZHANG, 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 and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHOU, Z. et al. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 154, p. 133–141, 2012.

_____. Immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking. **Catalysis Today**, v. 243, p. 173-183, 2014.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Recent progress in biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 16-18, p. 1081–1100, 2012.

ŽIVKOVIC, L. T. I. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 73-83, 2015.

ZOU, B. et al. Effect of surface modification of low cost mesoporous SiO₂ carriers on the properties of immobilized lipase. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 417, p. 210–216, 2014.