

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

RAFAELA SANTOS GAMA

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES INDUSTRIAIS EMPREGANDO BIOCATALISADORES
HETEROGÊNEOS PREPARADOS POR IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM
PARTÍCULAS DE BIOSÍLICA FUNCIONALIZADAS**

Alfenas/MG

2021

RAFAELA SANTOS GAMA

PRODUÇÃO DE ÉSTERES INDUSTRIAIS EMPREGANDO BIOCATALISADORES
HETEROGÊNEOS PREPARADOS POR IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM
PARTÍCULAS DE BIOSSÍLICA FUNCIONALIZADAS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Cancino Bernardi.

Alfenas/MG

2021

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

Gama, Rafaela Santos
G184p Produção de ésteres industriais empregando biocatalisadores heterogêneos preparados por imobilização de lipase em partículas de biossílica funcionalizadas / Rafaela Santos Gama – Alfenas, MG, 2021.
75 f.: il. –

Orientador: Adriano Aguiar Mendes.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Imobilização. 2. Lipase. 3. Sílica. 4. Óleos lubrificantes – Aspectos ambientais. 5. Óleo de soja. I. Mendes, Adriano Aguiar. II. Título.

CDD- 547

RAFAELA SANTOS GAMA

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES INDUSTRIAIS EMPREGANDO BIOCATALISADORES
HETEROGÊNEOS PREPARADOS POR IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM
PARTÍCULAS DE BIOSÍLICA FUNCIONALIZADAS**

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

Aprovada em: 22 de janeiro de 2021.

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Assinatura:



Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG)

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

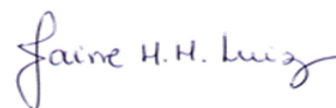
Assinatura:



Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dr.^a Jaine Honorata Hortolan Luiz

Assinatura:



Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG)

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, Glaucia Silva dos Santos e Joziel José Gama, que são meu porto seguro e a quem amo tanto.

Aos meus queridos amigos, em especial Lais Mendes Alvarenga, pelo apoio e cumplicidade, que me ajudaram tanto nesta jornada.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, em especial João Miguez, Wagner Carvalho, Nicole Okura, Willian de Souza e Guilherme Sabi, pela amizade e parceria.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação na Unifal-MG, em especial a Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz, que me ajudou pacientemente na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, orientador, pela amizade, dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança, que foram tão importantes para a realização desse trabalho. Obrigada por todo aprendizado e por todas experiências que me proporcionou. Serei eternamente grata por me guiar por esse caminho que sou extremamente feliz em trilhar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela sua excelência na formação de profissionais e incentivo à produção acadêmica.

À Universidade Federal de Alfenas por fazer parte do meu amadurecimento, desde a graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por financiarem e incentivarem a produção e publicação deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi a preparação e caracterização de um suporte renovável e hidrofóbico a partir de sílica de casca de arroz funcionalizadas com trietóxi(fenil)silano (PheTES) para a imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) por ativação interfacial e sua aplicação como biocatalisador na síntese de ésteres. A introdução dos grupamentos fenil na superfície do suporte foi confirmada por diferentes técnicas de microscopia, além da análise de fisissorção de nitrogênio, através do método de Brunnauer-Emmet-Teller (B.E.T.) e análise elementar (CHN). O suporte preparado obteve uma máxima concentração de LTL imobilizada da ordem de $27,7 \pm 2,3$ mg/g empregando um carregamento inicial de 40 mg de proteína/g de suporte. Este biocatalisador foi inicialmente utilizado na síntese de oleato de cetila (éster cosmético) em meio isento de solvente e máxima conversão de 92% foi alcançada após 330 min de reação. Testes de reuso revelaram que este biocatalisador reteve toda a sua atividade após 7 consecutivas bateladas de reação. Em um outro estudo, este biocatalisador foi empregado na produção de ésteres decílicos (biolubrificantes) a partir da esterificação de ácidos graxos livres (AGL) provenientes da hidrólise enzimática de óleo de soja refinado e processado (óleo de fritura) com decanol em meio isento de solvente. O seu desempenho catalítico foi comparado com LTL imobilizada em sílica de casca de arroz contendo grupos octil em sua superfície (Octil-SiO₂), um suporte com capacidade máxima de adsorção de proteína de $21,9 \pm 0,1$ mg/g e altamente ativo na síntese de ésteres cosméticos. Máxima porcentagem de conversão da ordem de 85% foi obtida após 120 min (AGL do óleo de fritura) e 150 min (AGL do óleo de soja refinado) nas reações catalisadas por LTL imobilizada em Octil-SiO₂. Testes de reuso em ambos sistemas reacionais revelaram que este biocatalisador reteve aproximadamente 88% de sua atividade original após 16 ciclos de esterificação em modo batelada. A formação de ésteres decílicos foi confirmada por ressonância magnética nuclear (RMN). Os valores de índice de viscosidade (IV entre 190 e 204) e massa específica ($0,865-0,867$ g/cm³) dos ésteres produzidos são bastante similares aos biolubrificantes comerciais e outros descritos na literatura, o que sugere que eles podem ser aplicados como biolubrificantes.

Palavras-chave: Imobilização. Lipase. Sílica. Biolubrificante. Óleo de soja.

ABSTRACT

The objective of this study consisted in the preparation and characterization of a renewable and hydrophobic support from rice husk silica functionalized with triethoxy(phenyl)silane (PheTES) to immobilize a microbial lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) via interfacial activation to be used as biocatalyst in ester production. The introduction of phenyl groups on its surface has been confirmed by microscopy (SEM, TEM and AFM), N₂ physisorption (B.E.T. method) and elemental analysis. This support had a maximum immobilized TLL concentration of 27.7 ± 2.3 mg/g using an initial protein loading of 40 mg/g. The biocatalyst prepared was used to produce cetyl oleate by esterification in a solvent-free system and maximum conversion of 92% was attained after seven successive batches of 330 min each. This biocatalyst was also used to catalyze biolubricants production via esterification of free fatty acids (FFA) from refined and frying soybean oils with decanol in solvent-free systems. Its catalytic activity has been compared with TLL immobilized via interfacial activation on rice husk silica chemically modified containing octyl groups (Octyl-SiO₂), a heterogeneous biocatalyst with a maximum immobilized TLL concentration of 21.9 ± 0.1 mg/g and active in the production of cetyl esters (cosmetic esters) and biosurfactants (solketal palmitate). According to results, maximum conversion percentage of $\approx 85\%$ has been attained within 120 min (FFA from frying oil) and 150 min (FFA from refined soybean oil) using TLL immobilized on Octyl-SiO₂. Reuse tests revealed that this biocatalyst retained 88% of its original activity after 16 consecutive batches of reaction for both reaction systems. The ester production has been confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. Viscosity index (VI from 190 to 204) and specific mass ($0.865\text{--}0.867$ g/cm³) values of these esters were similar to other synthetic esters, thus suggesting their promising application as alternative biolubricants.

Key-words: Immobilization. Lipase. Silica. Biolubricant. Soybean oil.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação aborda o preparo e caracterização de suportes hidrofóbicos preparados a partir da sílica de casca de arroz funcionalizada, que foram utilizados na imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) para a produção de ésteres com propriedades lubrificantes. O texto está dividido em três capítulos, além da introdução e dos anexos.

A Introdução apresenta a motivação e proposta do projeto, abordando o preparo e aplicação de biocatalisadores heterogêneos na produção de biolubrificantes, além dos objetivos geral e específicos.

O Capítulo 1 traz uma Revisão de Literatura que aborda a lubrificação e biolubrificantes, lipases, protocolos de imobilização de lipases com ênfase à ativação interfacial e por fim os suportes utilizados na imobilização de lipases. Dessa forma, esse capítulo embasa a pesquisa, as discussões e as considerações abordadas.

O Capítulo 2 reporta a preparação, funcionalização e caracterização de partículas de sílica de casca de arroz com grupos fenil que foram utilizadas na imobilização de LTL por ativação interfacial. O biocatalisador preparado foi utilizado na produção de oleato de cetila e sua estabilidade operacional foi avaliada após diversos ciclos reacionais. Estes resultados foram publicados no periódico indexado *Materials Chemistry and Physics* - <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.06.002>

No Capítulo 3 estão os resultados de produção de biolubrificantes por esterificação de ácidos graxos obtidos da hidrólise enzimática de óleo de soja refinado e de fritura catalisada por LTL imobilizada no suporte preparado acima e os seus resultados foram comparados com outro biocatalisador preparado em nosso grupo de pesquisa que consistiu na imobilização de LTL em partículas de sílica de casca de arroz funcionalizadas com grupos octil (Octil-SiO₂). Testes de reuso após 16 ciclos de reação foram realizados empregando o biocatalisador selecionado. Os ésteres foram purificados e caracterizados ressonância magnética nuclear e suas propriedades físicas tais como viscosidade e densidade foram também determinados. Parte destes resultados foram divulgados nos anais do XX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação realizado entre 21 e 23 de outubro de 2020 em São José dos Campos/SP. O trabalho foi intitulado “*Produção de biolubrificantes catalisada por lipase imobilizada em sílica de casca de arroz funcionalizada*”.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Esquema de lubrificação hidrodinâmica	18
Figura 2	-	Reações catalisadas por lipases	24
Figura 3	-	Hidrólises regioespecíficas promovidas pelas lipases.	25
Figura 4	-	Mecanismo de ativação interfacial das lipases.	26
Figura 5	-	Esquema das reações catalisadas pela lipase.	26
Figura 6	-	Protocolos de imobilização de lipases.	28
Figura 7	-	Imobilização de lipase por interações hidrofóbicas.....	29
Figura 8	-	Imagens de MEV da sílica não-funcionalizada	47
Figura 9	-	Imagens de MFA da sílica não-funcionalizada (A) e funcionalizada com PheTES (B).....	48
Figura 10	-	Imagens de MET da sílica não-funcionalizada (A e B) e Fenil-SiO ₂ (C).....	48
Figura 11	-	Efeito do tempo de reação na síntese do oleato de cetila, catalisada por LTL imobilizada em Fenil-SiO ₂	50
Figura 12	-	Testes de reuso do biocatalisador preparado pela imobilização de LTL em Fenil-SiO ₂ , na síntese de oleato de cetila em meio isento de solvente	51
Figura 13	-	Esquema de obtenção dos biolubrificantes por hidroesterificação enzimática dos óleos de soja e fritura.....	60
Figura 14	-	Efeito do tempo de reação na conversão enzimática de AGL do óleo de soja refinado (A) e de fritura (B).....	63
Figura 15	-	Testes de reuso em sistemas de bateladas sequenciais de reação de esterificação de AGL de óleo de soja refinado (a) e de fritura (b) com decanol catalisada por LTL-Octil-SiO ₂	65
Figura 16	-	Espectros de RMN das frações de hexano/éter dietílico 97:3 de OSR (azul), 97:3 de OSF (vermelho), 1:1 de OSR (verde) e 1:1 de OSF (rosa).....	66
Figura 17	-	Expansão do espectro de RMN de ¹ H na região de 3,2 ppm a 4,4 ppm.....	67
Figura 18	-	Expansão do espectro de RMN na região de 1,4 ppm a 2,8 ppm.....	67
Figura 19	-	Espectro de RMN ¹³ C do éster de OSR.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Exemplos de produções de biolubrificantes catalisadas por lipases imobilizadas.....	22
Tabela 2	- Parâmetros de imobilização dos biocatalisadores preparados....	61
Tabela 3	- Parâmetros físicos de ésteres com propriedades lubrificantes descritos na literatura.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-EH	2-etil-hexanol
AGL	Ácidos Graxos Livres
CLEA	Cross-Linked Enzyme Aggregate
EFS	Extração em Fase Sólida
EG	Etilenoglicol
GPTMS	3-(Glicidóxiopropil)trimetóxisilano
IV	Índice de viscosidade
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
NPG	Neopentilglicol
OCTES	Trietóxi (octil) silano
OSF	Óleo de Soja de Fritura
OSR	Óleo de Soja Refinado
PheTES	Trietóxi (fenil) silano
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SiO ₂	Sílica
TMP	Trimetilolpropano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 <i>LUBRIFICAÇÃO E BIOLUBRIFICANTES</i>	17
1.2 <i>LIPASE</i>	23
1.3 <i>IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES</i>	27
1.4 <i>SUORTE DE SÍLICA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES.....</i>	30
<i>REFERÊNCIAS.....</i>	32
CAPÍTULO 2	39
2.1 <i>INTRODUÇÃO</i>	41
2.2 <i>MATERIAIS E MÉTODOS.....</i>	42
2.2.1 <i>Materiais.....</i>	42
2.2.2 <i>Preparação das partículas de sílica via processo hidrotérmico.....</i>	43
2.2.3 <i>Funcionalização das partículas de sílica com trietoxi (fenil) silano.....</i>	43
2.2.4 <i>Caracterização das partículas de sílica</i>	43
2.2.5 <i>Procedimento de imobilização de lipases via adsorção hidrofóbica.....</i>	44
2.2.6 <i>Determinação dos parâmetros de imobilização.....</i>	44
2.2.7 <i>Síntese enzimática de ésteres por esterificação em meio isento de solventes</i>	45
2.2.8 <i>Testes de reuso do biocatalisador</i>	46
2.3 <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	46
2.3.1 <i>Caracterização das partículas de sílica</i>	46
2.3.2 <i>Caracterização do biocatalisador preparado por adsorção</i>	49
2.3.3 <i>Testes de reuso.....</i>	50
2.4 <i>CONCLUSÃO.....</i>	51
<i>REFERÊNCIAS.....</i>	52
CAPÍTULO 3	55
3.1 <i>INTRODUÇÃO</i>	56
3.2 <i>MATERIAIS E MÉTODOS.....</i>	57
3.2.1 <i>Materiais.....</i>	57
3.2.2 <i>Preparo dos biocatalisadores Fenil-SiO₂ e Octil-SiO₂.....</i>	57
3.2.3 <i>Obtenção dos ácidos graxos livres a partir da hidrólise do óleo de soja ..</i>	57
3.2.4 <i>Síntese enzimática de biolubrificante por esterificação em meio isento de</i>	

	<i>solvente</i>	58
3.2.5	<i>Testes de reuso</i>	60
3.2.6	<i>Extração do éster por SPE</i>	61
3.2.7	<i>Caracterização dos biolubrificantes por RMN</i>	61
3.2.8	<i>Análise de viscosidade dos biolubrificantes</i>	61
3.3	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	62
3.3.1	<i>Determinação dos parâmetros de imobilização</i>	62
3.3.2	<i>Síntese enzimática de biolubrificantes por esterificação em meio isento de solvente</i>	63
3.3.3	<i>Testes de estabilidade operacional do biocatalisador</i>	64
3.3.4	<i>Caracterização dos biolubrificantes por RMN</i>	66
3.3.5	<i>Análise de viscosidade dos biolubrificantes</i>	68
3.4	<i>CONCLUSÃO</i>	71
3.5	<i>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</i>	71
	<i>REFERÊNCIAS</i>	72

INTRODUÇÃO

Os lubrificantes são compostos utilizados na indústria com intuito de minimizar o atrito e calor entre as peças dos maquinários, protegendo-as contra a corrosão e desgaste (CHAN *et al.*, 2018; REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017; SYAHIR *et al.*, 2017; ZAINAL *et al.*, 2018). Estima-se que cerca de 30 a 40 milhões de toneladas de lubrificantes são utilizados anualmente e aproximadamente 55% são descartados no meio ambiente incorretamente (CHAN *et al.*, 2018; SYAHIR *et al.*, 2017; ZAINAL *et al.*, 2018). Cerca de 95% dos lubrificantes comercializados são à base de petróleo (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017; SYAHIR *et al.*, 2017). Esses produtos são compostos por diferentes hidrocarbonetos com 20 a 50 átomos de carbono e, portanto, possuem baixa biodegradabilidade e alta toxicidade (CECILIA *et al.*, 2020; REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017). O emprego desse tipo de lubrificante causa risco à saúde humana e é responsável pela contaminação do ar, solo e corpos d'água, quando descartados indevidamente (PARENTE *et al.*, 2020; ZAINAL *et al.*, 2018).

Os lubrificantes obtidos a partir de biomassa (ou biolubrificantes) surgiram como uma alternativa aos lubrificantes oriundos de fontes fósseis, pois eles possuem menor toxicidade e são biodegradáveis (CHAN *et al.*, 2018; HO; MCAULEY, PEPPLEY, 2019; REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017). Diversas fontes de lipídeos como óleos vegetais, gorduras animais, óleos microbianos e óleos residuais podem ser usadas como biolubrificantes naturais ou como matéria-prima para a produção de biolubrificantes sintéticos (HO; MCAULEY, PEPPLEY, 2019; KARMAKAR; GHOSH; SHARMA, 2017; PAPADAKI *et al.*, 2018; REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017; ZAINAL *et al.*, 2018). Estes lubrificantes possuem ótimas propriedades físico-químicas, são resistentes ao cisalhamento e são biodegradáveis, permitindo sua aplicação em diversos segmentos industriais (CECILIA *et al.*, 2020; HO; MCAULEY, PEPPLEY, 2019; ZAINAL *et al.*, 2018).

Apesar dessas vantagens, o uso de óleos vegetais como biolubrificantes possui algumas desvantagens, como menor fluidez em baixas temperaturas (podendo se solidificar no interior dos maquinários), baixa estabilidade térmica e pouca resistência à oxidação. A modificação química desses óleos vegetais é uma técnica comumente utilizada para melhorar suas capacidades lubrificantes e estabilidade termo-oxidativa, tornando-os muitas vezes mais eficientes que os

lubrificantes à base de petróleo (CECILIA *et al.*, 2020; PARENTE *et al.*, 2020).

Os ésteres sintéticos representam cerca de 25% dos lubrificantes comercializados (NOGALES-DELGADO; SÁNCHEZ; ENCINA, 2020). Estes compostos podem ser produzidos por diferentes rotas como epoxidação, esterificação, transesterificação e hidroesterificação (HO; MCAULEY, PEPPEY, 2019; MCNUTT; HE, 2016; PANCHAL *et al.*, 2017). A produção destes ésteres sintéticos tem sido realizada com a aplicação de catalisadores homogêneos e heterogêneos (HO; MCAULEY, PEPPEY, 2019; LAGE *et al.*, 2016; MCNUTT; HE, 2016; PANCHAL *et al.*, 2017). Do ponto de vista industrial, catalisadores heterogêneos são mais atrativos devido à maior facilidade de recuperação e baixa geração de resíduos químicos (GUPTA; AGARWAL; DALAI, 2020). Dentre eles, a aplicação de lipases imobilizadas como catalisador heterogêneo tem-se mostrado bastante promissora em função da alta atividade e especificidade para substratos naturais e sintéticos e requerimento de condições brandas de reações (ADLERCREUTZ, 2013). Além disso, a síntese enzimática de ésteres evita a formação de componentes de coloração escura produzidos em reações empregando catalisadores heterogêneos ácidos, que exigem etapas subsequentes de purificação (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

Lipases têm sido imobilizadas por diferentes protocolos para produzir biocatalisadores com alta atividade catalítica e estabilidades térmica, operacional e em solventes orgânicos, como ligação covalente em suportes ativados com agentes bifuncionais, adsorção física em suportes iônicos, hidrofílicos e hidrofóbicos e encapsulação em materiais orgânicos e inorgânicos (ADLERCREUTZ, 2013). A síntese enzimática de ésteres tem sido preferencialmente conduzida em meio orgânico (sistema com ou sem solventes) (BASSI *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016). Nestas condições, uma forte interação enzima/suporte não é necessária devido à insolubilidade da enzima neste meio. Deste modo, a adsorção física em suportes altamente hidrofóbicos é um protocolo adequado para imobilizar lipases (ADLERCREUTZ, 2013; ALVES *et al.*, 2016, 2017; BASSI *et al.*, 2016; CAVALCANTI *et al.*, 2018; LAGE *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018). Estas enzimas são imobilizadas por interação reversível da zona hidrofóbica da “tampa” e da área hidrofóbica próxima aos seus sítios-ativos com a superfície dos suportes (mecanismo de ativação interfacial). Elas reconhecem estes suportes como semelhantes aos seus substratos naturais (gotículas de óleo) (ADLERCREUTZ,

2013; RODRIGUES *et al.*, 2019). Este protocolo de imobilização promove a hiperativação e estabilização de lipases em conformação aberta. Além disso, estes suportes podem ser reutilizados após a inativação da molécula de lipase por dessorção utilizando vários produtos químicos (detergentes, guanidina, etc.) (ALVES *et al.*, 2017; CAVALCANTI *et al.*, 2018).

Diversos suportes têm sido utilizados para a imobilização de lipases, como nanopartículas magnéticas, quitosana, poli-metacrilato, sílica etc (BASSI *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2018; MIGUEZ *et al.*, 2018; OKURA *et al.*, 2020). A sílica tem sido amplamente utilizada como suporte para a imobilização de enzimas devido à sua alta área superficial, estabilidade térmica e mecânica, baixa toxicidade e capacidade de funcionalização de sua superfície (MACHADO *et al.*, 2018). Entretanto, o custo das partículas de sílica comercial é bastante elevado (SIGMA-ALDRICH, 2020), o que pode inviabilizar sua aplicação como suporte na imobilização de enzimas. A utilização de resíduos agrícolas para a produção de partículas de sílica é uma alternativa que permite a geração de suportes de baixo custo, tornando viável a sua utilização na imobilização de enzimas (MACHADO *et al.*, 2018; MENDOZA-ORTIZ *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2017).

Deste modo, o objetivo geral do presente estudo consistiu na preparação, caracterização e aplicação de biocatalisadores preparados por ativação interfacial de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) em suportes hidrofóbicos obtidos a partir de sílica de casca de arroz para a produção de ésteres com propriedades lubrificantes. Neste estudo, LTL foi selecionada como enzima modelo devido à sua alta atividade catalítica em reações de esterificação (GAMA *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2018; MENDOZA-ORTIZ *et al.*, 2020). Sílica de casca de arroz foi selecionado como suporte por se tratar de um resíduo agroindustrial facilmente encontrado em nosso país, o 11º maior produtor mundial deste cereal na safra de 2020/2021 estimada em 6,87 bilhões de toneladas (<http://www.worldagriculturalproduction.com/crops/rice.aspx>). Na produção de biolubrificantes, óleo de soja e de fritura foram empregados como matéria-prima oleaginosa devido também a fácil obtenção em nosso país. Em 2020, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de soja e, conseqüentemente, de óleo de soja, com uma safra estimada em 131 bilhões de toneladas (<https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=soybean-oilseed&graph=production>). Deste modo, o país torna-se também um dos maiores

produtores mundiais de óleo de soja processado (óleo de fritura), um subproduto gerado na indústria de alimentos. O uso de óleo residual na produção de biolubrificantes é atrativo porque não compete com a indústria de alimentos e minimiza alguns problemas ambientais pelo seu descarte em rios e lagos. Apenas um litro de óleo de fritura é capaz de esgotar o oxigênio dissolvido de até 20 mil litros de água, formando, em poucos dias, uma fina camada sobre uma superfície de 100 m² que bloqueia a passagem de ar e luz e, conseqüentemente, impede a respiração e a fotossíntese (<http://www.biocoleta.com/novosite/impactos-ambientais-causados-pelo-oleo-usado-de-fritura/>). Vale ressaltar que o projeto executado é inovador, pois a preparação de um suporte obtido a partir de sílica de casca de arroz funcionalizado com grupos fenil e sua aplicação na preparação de um biocatalisador heterogêneo não é reportado na literatura.

O objetivo geral do projeto foi alcançado mediante a execução dos seguintes objetivos específicos:

- a) Preparação das partículas de sílica por tratamento hidrotérmico e funcionalização com trietóxi(fenil)silano (PheTHES) e trietóxi(octil)silano (OCTES);
- b) Preparação dos biocatalisadores heterogêneos via ativação interfacial de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e determinação dos parâmetros de imobilização;
- c) Obtenção de ácidos graxos livres (AGL) através da hidrólise de óleo de soja refinado (OSR) e óleo de soja de fritura (OSF), utilizando lipase de *Candida rugosa* (LCR);
- d) Produção dos biolubrificantes por esterificação direta de AGL e decanol, em meio isento de solvente;
- e) Testes de estabilidade operacional (reuso do biocatalisador);
- f) Extração dos ésteres obtidos através da extração em fase sólida (EFS);
- g) Caracterização dos ésteres extraídos através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- h) Determinação das propriedades físicas dos biolubrificantes;

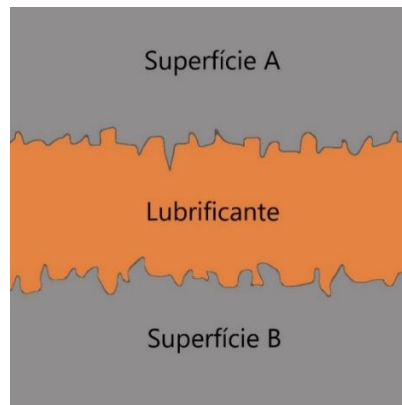
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 LUBRIFICAÇÃO E BIOLUBRIFICANTES

A lubrificação tem como objetivo principal facilitar o movimento relativo de peças de um maquinário, reduzindo à níveis aceitáveis o desgaste e o calor entre as superfícies de contato em movimento (HO; MCAULEY, PEPPLEY, 2019; ZAINAL *et al.*, 2018). Como o calor e o desgaste estão associados ao atrito, ambos os efeitos podem ser minimizados reduzindo o coeficiente de atrito entre as superfícies de contato (CECILIA *et al.*, 2020). A lubrificação também é usada para reduzir a oxidação e prevenir a ferrugem; para fornecer isolamento em aplicações de transformador; para transmitir potência mecânica; e para vedar contra poeira, sujeira e água (CECILIA *et al.*, 2020; CERÓN *et al.*, 2018). Os lubrificantes possuem um papel muito importante na indústria: sem a lubrificação não há a transferência de energia. A redução do atrito promovida pelos lubrificantes permite que os maquinários trabalhem sem falha precoce, aumentando a vida útil dos equipamentos (ZAINAL *et al.*, 2018).

Existem dois tipos de lubrificação: a lubrificação hidrodinâmica e a lubrificação limítrofe, sendo a primeira mais comum. Na lubrificação hidrodinâmica, as superfícies são inteiramente separadas por um filme formado pelo lubrificante (Figura 1), enquanto na lubrificação limítrofe a separação é parcial (SETHURAMIAH; KUMAR, 2016). No primeiro tipo, não há desgaste das peças pois não há contato entre elas. O único atrito presente neste tipo de lubrificação é o atrito do próprio lubrificante e, por esse motivo, quanto menor a viscosidade do líquido, menor o atrito produzido por ele. Entretanto, uma viscosidade muito baixa diminui a distância entre as superfícies, o que pode ser prejudicial para a lubrificação. Além disso, deve-se considerar a temperatura de operação, já que a viscosidade é dependente deste fator (AHMED; NASSAR, 2013).

Figura 1 - Esquema de lubrificação hidrodinâmica.



Fonte: do autor.

As principais propriedades físicas associadas a um lubrificante são (SINGH; SHARMA; SINGLA, 2019; ZAINAL *et al.*, 2018):

- a) Viscosidade: é a medida do atrito interno de um líquido, a maneira como as moléculas interagem para resistir ao movimento. Essa propriedade influencia diretamente na capacidade de formar um filme do lubrificante e, por consequência, de minimizar o atrito;
- b) Índice de viscosidade: é um parâmetro que avalia o efeito da temperatura na viscosidade da amostra. A viscosidade da amostra é medida em duas temperaturas diferentes (40 e 100°C) e comparadas com uma escala de referência empírica;
- c) Ponto de nuvem: é a temperatura na qual há o primeiro sinal de solidificação do lubrificante, formando pequenos cristais em sua amostra, que se torna turva;
- d) Ponto de fluidez: é a temperatura na qual a amostra pode fluir apenas pela gravidade;
- e) Volatilidade: é um parâmetro importante que indica a perda do produto por evaporação durante a operação;
- f) Ponto de ebulição: é um parâmetro importante do ponto de vista da segurança operacional, porque é a menor temperatura que a autoignição do vapor ocorre;
- g) Condutividade térmica: está relacionada com a capacidade do lubrificante de trocar calor com o maquinário, impedindo o superaquecimento das peças;

Os lubrificantes podem ser classificados de acordo com seu estado físico: semissólidos (graxas), sólidos, gasosos (ar comprimido) e líquidos (óleos) (PANCHAL *et al.*, 2017; SINGH; SHARMA; SINGLA, 2019). Os mais utilizados são os lubrificantes líquidos, que podem ser obtidos de três fontes: biológica, mineral ou sintética. Os óleos de origem biológica são frequentemente utilizados em equipamentos onde o risco de contaminação deve ser mínimo, como na indústria alimentícia e farmacêutica. Estes óleos podem ser de origem vegetal, como o óleo de palma, óleo de semente de mamona e óleo de soja, ou de origem animal, como espermacete de baleia e óleo de peixe (AHMED; NASSAR, 2013). Os óleos de origem mineral são os mais utilizados na indústria devido sua disponibilidade, custo e compatibilidade com diversos tipos de maquinário (CERÓN *et al.*, 2018). Eles são produzidos a partir do petróleo e só podem ser utilizados em operações onde a temperatura é moderada, devido ao risco de autoignição. Os óleos sintéticos surgiram com a finalidade de substituir o uso de óleos minerais, possuindo propriedades superiores a estes óleos, como a resistência à altas temperaturas e aplicabilidade em baixas temperaturas (AHMED; NASSAR, 2013).

Outro tipo de classificação dos lubrificantes é baseado na origem da matéria-prima, dividindo-os em renováveis e não-renováveis. Os lubrificantes não-renováveis são provenientes do petróleo, como o óleo mineral e seus derivados, enquanto os renováveis são feitos a partir de óleos de origem biológica e seus derivados, sendo frequentemente chamados de lubrificantes biodegradáveis ou biolubrificantes (CERÓN *et al.*, 2018; ZAINAL *et al.*, 2018). Os produtos renováveis feitos a partir de plantas são ecologicamente sustentáveis porque possuem o ciclo do carbono fechado. Isto significa que ao serem descartados, depois de sofrerem diversas reações de decomposição no meio ambiente, os biolubrificantes são reduzidos à dióxido de carbono e água. O CO₂ gerado nessa decomposição é eliminado e, posteriormente, utilizado para a fotossíntese nas plantas que dão origem a esses produtos, mantendo o balanço de carbono na atmosfera. Por outro lado, os óleos minerais aumentam a quantidade de dióxido de carbono na atmosfera, levando ao aquecimento global (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017; ZAINAL *et al.*, 2018). Até o final do século XIX, os óleos de origem biológica eram a principal fonte de lubrificantes. Com a descoberta do petróleo, a grande disponibilidade de óleos minerais tornou os lubrificantes feitos a partir desta matéria-prima economicamente atrativos, diminuindo o interesse pelos lubrificantes biodegradáveis. Recentemente,

o decréscimo das reservas de petróleo e a alta demanda por produtos ecologicamente sustentáveis levaram ao aumento da procura por biolubrificantes (CECILIA *et al.*, 2020; ZAINAL *et al.*, 2018).

Os ésteres sintéticos são compostos feitos a partir de ácidos carboxílicos e álcoois e possuem grande importância na formulação de biolubrificantes. Eles geralmente não são tóxicos, possuem alta biodegradabilidade e muitas vezes possuem um desempenho melhor que os óleos minerais. Além disso, outras características associadas à sua massa molecular elevada, como alto índice de viscosidade, alto ponto de ebulição e baixa volatilidade, tornam esses ésteres excelentes para a aplicação em altas temperaturas (incluindo temperaturas acima de 200 °C) (CECILIA *et al.*, 2020; CHAN *et al.*, 2018; HO; MCAULEY, PEPPLEY, 2019).

Os ésteres de ácidos graxos (ésteres de cera) apresentam uma extensa cadeia carbônica que confere a eles menor atrito e desgaste, quando comparado a outros ésteres sintéticos (CERÓN *et al.*, 2018). Esses ésteres podem ser obtidos por diversas reações utilizando óleos vegetais como materiais de partida, como esterificação/transesterificação, hidrogenação, epoxidação e formação de estolídeos (CECILIA *et al.*, 2020; ZAINAL *et al.*, 2018).

A esterificação/transesterificação é a estratégia mais utilizada para a produção de biolubrificantes a partir de óleos vegetais. As reações de transesterificação envolvem a substituição da porção de glicerol dos triglicerídeos por álcoois de cadeia longa ou ramificados, enquanto a esterificação utiliza os ácidos graxos provenientes desses óleos vegetais para reação envolvendo álcoois de cadeia longa (CAVALCANTI *et al.*, 2018; HEIKAL *et al.*, 2017; ZAINAL *et al.*, 2018). Essas reações geralmente são catalisadas por ácidos minerais (como HCl e H₂SO₄) ou bases (como CaO). A transesterificação homogênea de óleos vegetais possui algumas desvantagens como: dificuldade na recuperação do catalisador, produção em larga escala de água residual e requerimento de materiais de partida de alta qualidade (e alto custo), com baixos teor de ácidos graxos livres (acidez menor que 0,5%) e água, para evitar reações de saponificação (AMIRIL *et al.*, 2018; GHAFAR *et al.*, 2019). Estes óleos refinados são relativamente caros, e são responsáveis por 70 a 80% dos custos da produção do biolubrificantes, dificultando a competitividade de preços com os feitos a partir do petróleo (SARNO; IULIANO; CIRILLO, 2019; ZHANG *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, o uso de processos enzimáticos para a produção de

biolubrificantes surgiu como uma alternativa à catalise química, por utilizar baixas temperaturas de operação e garantir um produto mais puro (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016; CECILIA *et al.*, 2020; THANGARAJ; SOLOMON, 2019). A Tabela 1 mostra alguns exemplos de produção de biolubrificantes utilizando lipases como catalisadores e óleos vegetais como materiais de partida.

Tabela 1 - Exemplos de produções de biolubrificantes catalisadas por lipases imobilizadas

Ácido	Álcool	Razão molar ácido/álcool	Lipase	Suporte	Condições	Conversão	Fonte
Ácido oleico	n-octanol	1:1,5	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Polimeta- acrilato (PMA)	45°C; 10% (m/v); 1h; 240 rpm	95%	Bassi <i>et al.</i> , 2016.
Ácido oleico de óleo de palma	Trimetilolproprano (TMP)	3,1:9,2	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Duolite A568	60°C; 15% (m/m); 9h; 250 rpm; sob vácuo (6,7 kPa)	95%	Kim <i>et al.</i> , 2019.
AGL de óleo de soja	Neopentilglicol (NPG)	1:1	<i>Candida rugosa</i>	Poli(metil) metacrilato (PMMA)	45°C; 4% (m/m); 6h.	90%	Fernandes <i>et al.</i> , 2020
Ácido oleico	Decanol	1:1	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Amino- SiO ₂	30°C; 21% (m/v); 3h; 150 rpm	87%	Miguez <i>et al.</i> , 2018

Fonte: do autor.

1.2 LIPASE

Enzimas são proteínas que atuam na diminuição da energia de ativação de reações químicas, provocando o aumento da velocidade reacional. A atividade catalítica destes biocatalisadores depende da integridade de sua conformação tridimensional, que é mantida através das interações intermoleculares de seus aminoácidos constituintes. As enzimas possuem uma região específica chamada de sítio-ativo, onde o substrato interage para formar os produtos (SHARMA; UPADHYAY, 2020).

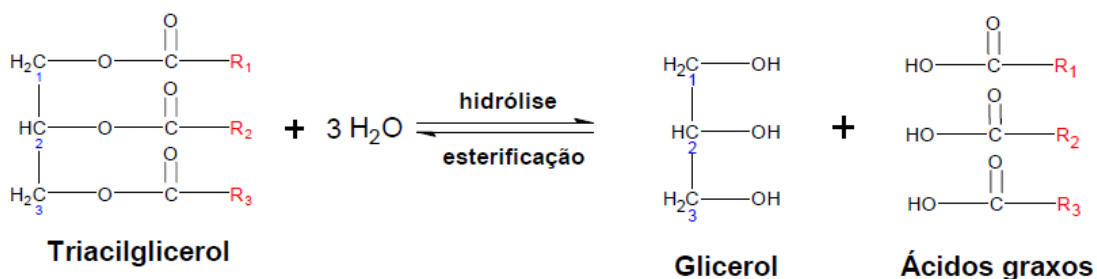
A utilização de enzimas como biocatalisadores na indústria apresenta diversas vantagens quando comparada com a utilização de catalisadores químicos (MONTEIRO *et al.*, 2020). Elas são altamente seletivas e específicas e atuam em condições amenas (como temperatura ambiente e pressão atmosférica), tornando-as excelentes para aplicação na indústria química (MONTEIRO *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Dentre as enzimas de interesse industrial, as lipases são as mais utilizadas devido a afinidade por diferentes substratos, a ausência de co-fatores e a capacidade de atuar em meio a altas concentrações de substratos, permitindo sua aplicação em diversos processos industriais, como na formulação de detergentes, cosméticos, biolubrificantes, alimentos etc (ISMAIL; BAEK, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2019).

As lipases (triacilglicerol hidrolases [EC 3.1.1.3]) são enzimas da classe das hidrolases, presentes em diversos organismos (animais, plantas e microrganismos). A função dessas enzimas nestes organismos é catalisar reações de hidrólise de triacilglicerol, formando glicerol e ácidos graxos (ADLERCREUTZ, 2013; ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016; JAVED *et al.*, 2018; SHUAI *et al.*, 2017). A energia livre da hidrólise de triacilglicerol promovida pela lipase é aproximadamente 0 kJ/mol, resultando em um equilíbrio termodinâmico governado principalmente pela concentração dos reagentes. Deste modo, a ausência de água no meio reacional promove reações inversas a hidrólise, como esterificação, interesterificação e transesterificação (ISMAIL; BAEK, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2020). As lipases, comparadas a outras enzimas, são estáveis a uma variedade de solventes orgânicos não-aquosos, o que permite que elas catalisem não apenas a hidrólise de óleos e gorduras em meio aquoso, como também reações de esterificação em meio

orgânico, como mostra o esquema na Figura 2 (ADLERCREUTZ, 2013; JAVED *et al.*, 2018).

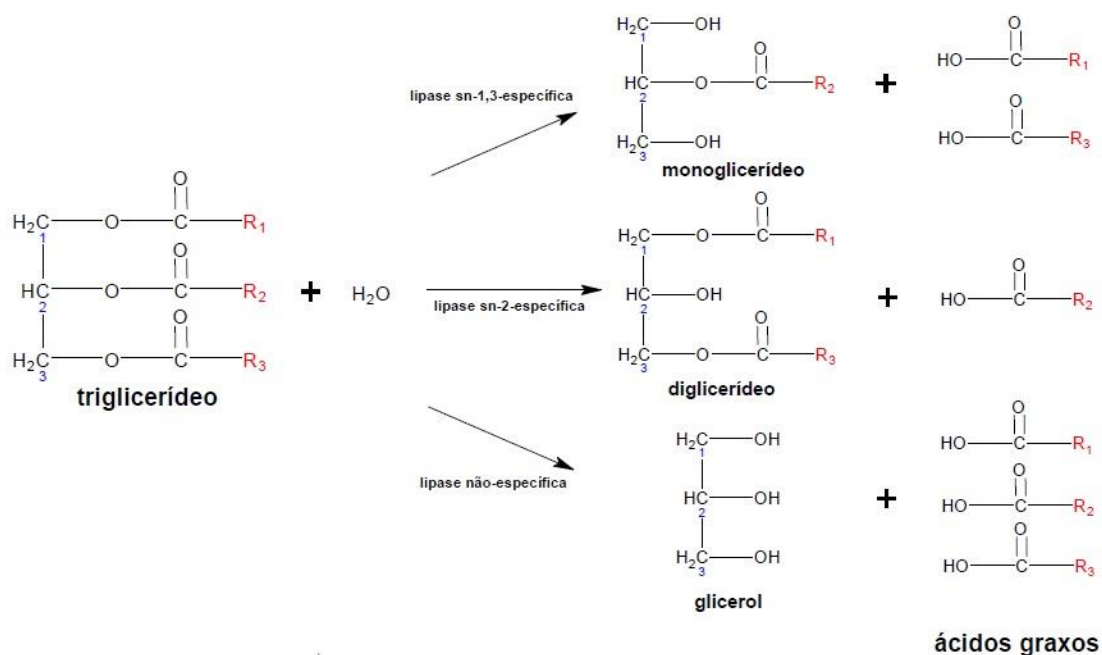
Figura 2 - Reações catalisadas por lipases



Fonte: do autor.

As lipases podem ser classificadas de acordo com a regioespecificidade das reações de hidrólise de triglicerídeos, ou seja, nas diferentes posições das ligações entre os ácidos graxos e o glicerol. As lipases mais comuns são as sn-1,3-específicas (lipases de *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger* e *Rhizomucor miehei*, por exemplo), que hidrolisam as ligações ésteres presentes nos carbonos sn-1 e sn-3 do esqueleto de glicerol dos triglicerídeos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Da mesma maneira, há lipases que são sn-2-específicas, que atuam apenas nas ligações ésteres presentes no carbono sn-2 do glicerol. Há também as não-específicas, como as de *Candida rugosa* e *Pseudomonas cepacia*, que hidrolisam aleatoriamente todas as ligações ésteres dos triglicerídeos, permitindo a obtenção de todos os ácidos graxos presentes e das moléculas de glicerol (MONTEIRO *et al.*, 2020). A Figura 3 esquematiza as reações de hidrólise regioespecíficas promovidas pela lipase.

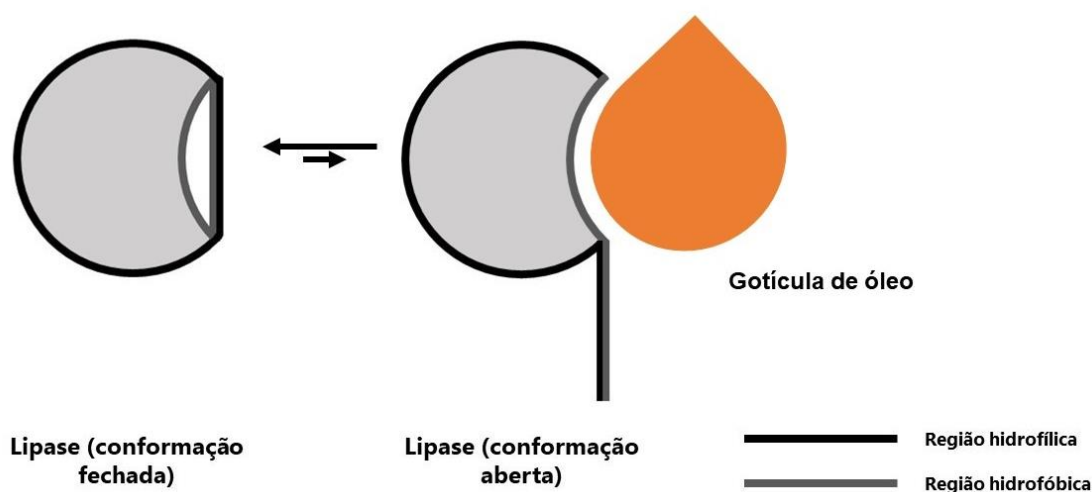
Figura 3 - Hidrólises regioespecíficas promovidas pelas lipases



Fonte: do autor.

A maioria das lipases possui uma estrutura polipeptídica que recobre o sítio-ativo (chamada de “tampa” ou *lid*, do inglês), constituída de uma face hidrofílica e uma face hidrofóbica (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2019). A porção hidrofóbica desse resíduo polipeptídico interage com as áreas hidrofóbicas que circundam o sítio-ativo, tornando-o inacessível ao meio reacional (conformação fechada). Em meio aquoso, a lipase tende a permanecer na conformação fechada para reduzir a tensão superficial (ADLERCREUTZ, 2013; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Contudo, na presença de uma interface lipídica (como as gotículas de óleo) ou uma estrutura hidrofóbica (como um suporte hidrofóbico), a porção hidrofóbica da tampa interage com essa interface e expõe o sítio-ativo, permitindo o acesso ao substrato (conformação aberta) (ADLERCREUTZ, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2020). A atividade catalítica das lipases é ativada pela presença da interface e, por esse motivo, este mecanismo é chamado de ativação interfacial (ADLERCREUTZ, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2019). A Figura 4 apresenta um esquema do mecanismo da ativação interfacial.

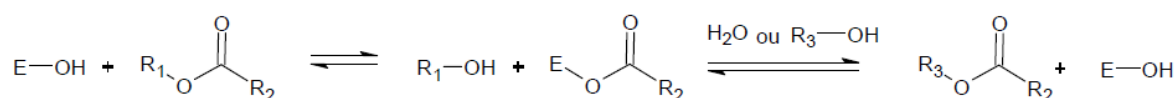
Figura 4 - Mecanismo de ativação interfacial das lipases



Fonte: do autor.

O sítio-ativo das lipases é composto, na maioria dos casos, por uma tríade catalítica constituída de um resíduo nucleofílico de serina, seguido de uma histidina e aspartato, unidos por ligações de hidrogênio (ADLERCREUTZ, 2013; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A ativação interfacial leva a criação de uma superfície hidrofóbica na enzima, permitindo o acesso do substrato à cavidade onde se encontra a tríade catalítica. A hidroxila do resíduo de serina promove um ataque nucleofílico no carbono carbonílico do substrato, liberando o álcool correspondente e formando o intermediário acil-enzima. Na presença de água, esse intermediário é hidrolisado, liberando o ácido carboxílico e restaurando a forma original da enzima. A Figura 5 esquematiza essas reações catalisadas pela lipase. Além da água, outras substâncias podem atuar na desacilação da enzima, como diversos álcoois, promovendo uma esterificação ou transesterificação (ADLERCREUTZ, 2013).

Figura 5 - Esquema das reações catalisadas pela lipase



Fonte: do autor.

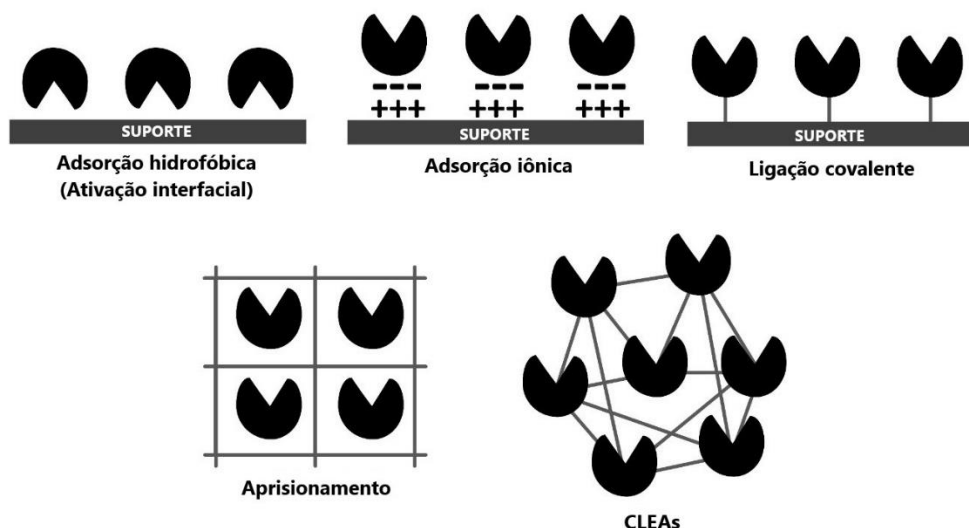
Uma das lipases mais utilizadas em processos industriais é a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL). Esta enzima é sn-1,3-específica, contendo 269 resíduos de aminoácidos, massa molecular de cerca de 31,7 kDa e ponto isoelétrico em pH 4,4. Sua ampla utilização está relacionada com a alta estabilidade térmica que essa enzima possui, atuando em temperaturas na faixa de 55-60 °C (MONTEIRO *et al.*, 2020).

Apesar da variedade de aplicações desses biocatalisadores, a utilização de enzimas em sua forma livre não é adequada para o uso industrial devido à baixa estabilidade em meios reacionais diferentes dos naturais, que geralmente possuem condições drásticas como a presença de solventes orgânicos e altos valores de temperatura e pH (MONTEIRO *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2019). Diversas técnicas empregando engenharia genética (metagenômica, evolução dirigida, DNA-recombinante etc) surgiram para minimizar esses efeitos durante as reações de interesse industrial (MONTEIRO *et al.*, 2020). Uma outra abordagem amplamente utilizada para aumentar a estabilidade das enzimas é a imobilização. Esta técnica permite a aplicação das enzimas em diferentes sistemas reacionais (solventes orgânicos, temperaturas e pH), bem como a fácil recuperação e reutilização dos biocatalisadores, permitindo sua aplicação em diversos ciclos reacionais e processos contínuos (RODRIGUES *et al.*, 2019; THANGARAJ; SOLOMONS, 2019).

1.3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A imobilização consiste no confinamento dessas macromoléculas em uma fase diferente da do meio reacional (suportes sólidos), permitindo uma fácil recuperação desses biocatalisadores. Há diversas técnicas que possibilitam o confinamento das enzimas nas matrizes sólidas, como a adsorção, ligação covalente, ligação cruzada (CLEA) e encapsulamento, esquematizadas na Figura 6 (ADLERCREUTZ, 2013). A imobilização combina a seletividade e especificidade da enzima com as propriedades físicas e químicas dos suportes, aumentando a estabilidade física e catalítica do biocatalisador (BASSO; SERBAN, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2018; CERÓN *et al.*, 2018; GRECO-DUARTE *et al.*, 2017). Esse procedimento torna possível a aplicação de processos enzimáticos em modo contínuo e permite uma recuperação do produto com alto grau de pureza (ZHONG *et al.*, 2020).

Figura 6 - Protocolos de imobilização de lipases



Fonte: do autor.

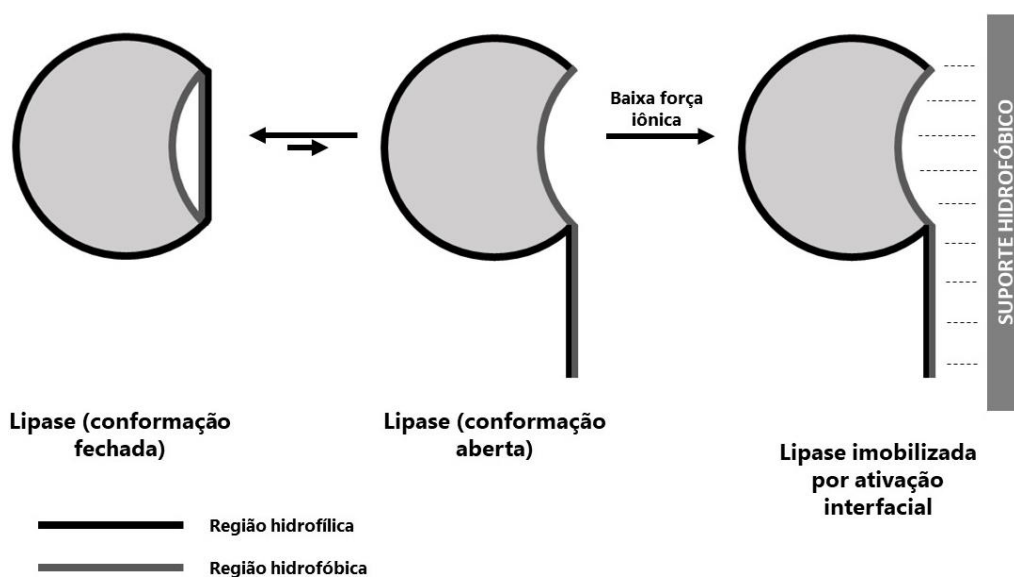
Embora as lipases apresentem áreas hidrofóbicas em sua superfície, elas raramente são solúveis em solventes orgânicos. Essa característica confere às enzimas solubilizadas em meio orgânico uma diminuição na conversão de éster, quando comparada a enzimas imobilizadas em suportes, sob mesmas condições. As lipases livres, na presença de solventes orgânicos, se aglomeram para diminuir a tensão superficial, bloqueando parcialmente o sítio-ativo e dificultando os processos de transferência de massa, o que causa a redução da atividade enzimática (ADLERCREUTZ, 2013).

A adsorção é uma das técnicas mais utilizadas na imobilização de lipases (MULINARI; OLIVEIRA; HOTZA, 2020; ZHAO; ZHOU; LIU, 2019). A técnica se baseia na interação da enzima com o suporte por meio de diferentes interações não-covalentes, como ligações iônicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas etc (MULINARI; OLIVEIRA; HOTZA, 2020; REIS *et al.*, 2019; ZHAO; ZHOU; LIU, 2019). Em comparação com as outras técnicas, a imobilização por adsorção possui diversas vantagens, como condições simples no preparo do biocatalisador, o baixo custo dos carreadores, a ausência de aditivos químicos durante a adsorção, a facilidade de regeneração do suporte e a alta atividade das lipases imobilizadas (ADLERCREUTZ, 2013; ALVES *et al.*, 2017; BOLINA *et al.*, 2018; LAGE *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018; MIGUEZ *et al.*,

2018).

As lipases tendem a formar agregados bimoleculares através da interação da parte hidrofóbica da tampa de duas moléculas adjacentes. Esta característica pode diminuir a eficiência da imobilização, bem como a atividade catalítica das enzimas (MACHADO *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019; VIRGEN-ORTIZ *et al.*, 2017). Alguns estudos sugerem o uso de detergentes que possam desfazer a formação desses agregados, garantindo a imobilização da lipase em sua forma monomérica. Entretanto, a utilização desses reagentes pode inativar a enzima (RODRIGUES *et al.*, 2019). O uso de suportes hidrofóbicos para a imobilização de lipases é uma solução para tal problema, pois garante a imobilização dessas enzimas em sua forma monomérica e na conformação aberta, como mostra a Figura 7 (ALVES *et al.*, 2016; 2017; MACHADO *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019). A interação entre a enzima e o suporte é promovida de forma análoga ao fenômeno de ativação interfacial já discutido acima. A lipase reconhece a superfície hidrofóbica do suporte, alterando sua conformação para sua forma aberta e, conseqüentemente, se adere a matriz por meio das interações hidrofóbicas. Esse mecanismo mantém a enzima em sua forma ativa, aumentando sua atividade catalítica. Esse é um método relativamente simples de ser aplicado, já que em contato com uma solução enzimática, o suporte hidrofóbico promove uma partição, fazendo com que as enzimas migrem para a superfície do sólido (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Figura 7 - Imobilização de lipase por interações hidrofóbicas



Fonte: do autor.

O aumento da hidrofobicidade do suporte garante uma quantidade maior de lipase imobilizada (RODRIGUES *et al.*, 2019). Em um estudo recente, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada em Octil-SiO₂ (interação hidrofóbica) e em Amino-SiO₂ (interação iônica), para avaliar o efeito da funcionalização na imobilização. Os valores de proteína imobilizada e energia livre de adsorção sugerem que o aumento da hidrofobicidade causado pela funcionalização com OCTES permite a criação de um microambiente mais favorável para a adsorção da LTL, em um processo mais espontâneo do que ocorre na Amino-SiO₂ (MACHADO *et al.*, 2018).

1.4 SUPORTE DE SÍLICA PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A aplicação de sílica (SiO₂) como suporte na imobilização de enzimas tem sido amplamente reportada pela literatura devido à sua elevada área superficial, diâmetro de poros e possibilidade de funcionalização com agentes químicos, para a produção de suportes versáteis contendo diferentes grupos funcionais (BABAKI *et al.*, 2016; BANJANAC *et al.*, 2016; BOLINA *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2018; MIGUEZ *et al.*, 2018). As partículas de sílica são comumente adquiridas comercialmente de diferentes empresas ou produzidas via técnica sol-gel empregando diferentes precursores silanos (HUANG; LI; ZHENG, 2016; WANG *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016). O custo de partículas de sílica pode variar de R\$ 1166,00/kg a R\$ 978,00 o grama (SIGMA-ALDRICH, 2020). Apesar das diversas vantagens do uso dessas partículas, o alto custo pode inviabilizar sua aplicação na imobilização de enzimas. Uma alternativa é a utilização de resíduos agrícolas para a obtenção de sílica. O uso de biomassa para a produção de diferentes materiais tem se destacado devido ao seu baixo custo, abundância, rápida regeneração e o fato de ser ecologicamente sustentável (ZHANG *et al.*, 2017). Diversos resíduos podem ser utilizados para tal finalidade, como a casca do amendoim, folhas de bambu, bagaço de cana-de-açúcar e a casca de arroz (VAIBHAV; VIJAYALAKSHMI; ROOPAN, 2015). Dentre eles, a casca de arroz tem sido amplamente utilizada devido à alta concentração de SiO₂ presente nesse resíduo, em torno de 20% da massa (YU *et al.*, 2014). O arroz absorve a sílica do solo na forma de ácido silícico (Si(OH)₄), que se acumula nos micro-compartimentos de celulose presentes na casca (ZHANG *et al.*, 2017).

O arroz é um dos cereais mais consumidos no mundo. Estima-se que a produção mundial de arroz entre os anos de 2019 e 2020 foi de aproximadamente 494,2 milhões de toneladas, sendo 10,5 milhões de toneladas apenas no Brasil (CONAB, 2020). De acordo com estudos reportados na literatura, para cada quilo de arroz processado é gerado cerca de 20% (m/m) de casca (ALVAREZ *et al.*, 2015). Portanto, a produção nacional de casca de arroz foi de aproximadamente 2,1 milhões de toneladas.

Diversos estudos empregaram a sílica de casca de arroz na imobilização de lipases (BOLINA *et al.*, 2018; GAMA *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2018; MIGUEZ *et al.*, 2018). As partículas de sílica obtidas apresentam elevada área superficial, da ordem de 222 m²/g (BOLINA *et al.*, 2018), o que as tornam bastante promissoras na preparação de biocatalisadores. Por esse motivo, o presente estudo produziu partículas de sílica através do tratamento hidrotérmico de casca de arroz, um resíduo agroindustrial de fácil obtenção em nosso país, para sua utilização como suporte na imobilização de lipases.

Embora a aplicação de sílica seja atrativa na imobilização de lipases, este suporte apresenta elevada capacidade de retenção de compostos hidrofílicos gerados em reações em meio orgânico como esterificação (moléculas de água) e transesterificação (moléculas de glicerol), por interação através de ligações de hidrogênio com os grupos silanois (Si-OH) existentes em sua estrutura (SALIBA *et al.*, 2016). A retenção destes compostos reduz drasticamente a atividade catalítica dos biocatalisadores porque favorece a dessorção da enzima e induz a formação de uma camada hidrofílica que minimiza a partição de substratos hidrofóbicos ao seu microambiente (MACHADO *et al.*, 2018). Com o intuito de minimizar estas limitações, o suporte preparado foi funcionalizado por reação com OCTES e PheTES. A inserção de grupos octil e fenil aumenta consideravelmente a hidrofobicidade do suporte, o que é atrativo para a imobilização de lipases que possuem elevada afinidade com superfícies altamente hidrofóbicas e melhora a difusão de substratos hidrofóbicos ao microambiente do biocatalisador (MACHADO *et al.*, 2018), incluindo os ácidos graxos livres (AGL) e o decanol.

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases inorganic media. **Chemical Society Reviews**, [United Kingdom], v. 42, p. 6406-6436, 2013.

AHMED, N. S.; NASSAR, A. M. Lubrication and Lubricants. *In*: GEGNER, J. **Tribology: fundamentals and advancements**. [Rijeka]: InTech, 2013, p. 55-76.

ALVAREZ, J.; LOPEZ, G.; AMUTIO, M.; BILBAO, J.; OLAZAR, M. Physical activation of rice husk pyrolysis char for the production of high surface area activated carbons. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [United States], v. 54, p. 7241-7250, 2015.

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

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

AMIRIL, S. A. S.; RAHIM, E. A.; EMBONG, Z; SYAHRULLAIL, S. Tribological investigations on the application of oil-miscible ionic liquids additives in modified Jatropha-based metalworking fluid. **Tribology International**, [United Kingdom], v. 120, p. 520-534, 2018.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 7, p. 257-270, 2016.

BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M.; YOUSEFI, P.; MOHAMMADI, J.; BRASK, J. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, t-butanol and blue silica gel contents. **Renewable Energy**, [United Kingdom], v. 91, p. 196-206, 2016.

BANJANAC, K.; MIHAILOVIC, M.; PRLAINOVIC, N.; STOJANOVIC, M.; CAREVIC, M.; MARINKOVIC, A.; BEZBRADICA, D. Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [United States], v. 91, p. 439-448, 2016.

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

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. **Molecular Catalysis**, [s. l.], v. 479, 2019.

BOLINA, I. C. A. **Preparação e caracterização de biocatalisadores heterogêneos para a produção de biolubrificante**. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2020.

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

CAVALCANTI, E. D. C.; AGUIEIRAS, E. C. G.; SILVA, P. R.; DUARTE, J. G.; CIPOLATTI, E. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SILVA, J. A. C.; FREIRE, D. M. G. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, [Netherlands], v. 215, p. 705-713, 2018.

CECILIA, J. A.; PLATA, D. B.; SABOYA, R. M. A.; LUNA, F. M. T.; CAVALCANTE JR, C. L.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E. An overview of the biolubricant production process: Challenges and future perspectives. **Processes**, [Switzerland], v. 8, p. 257, 2020.

CERÓN, A. A.; VILAS BOAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, [United Kingdom], v. 119, p. 166-172, 2018.

CHAN, C. H.; TANG, S. W.; MOHD, N. K.; LIM, W. H.; YEONG, S. K.; IDRIS, Z. Tribological behavior of biolubricant base stocks and additives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [Netherlands], v. 93, p. 145-157, 2018.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2020) Boletim da safra de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 20 nov. 2020.

FERNANDES, K. V.; CAVALCANTI, E. D. C.; CIPOLATTI, E. P.; AGUIEIRAS, E. C. G.; PINTO, M. C. C.; TAVARES, F. A.; SILVA, P. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARANA-PEÑA, S.; PINTO, J. C.; ASSUNÇÃO, C. L. B.; SILVA, J. A. C.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**, [Netherlands], 2020.

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

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization

methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [Germany], v. 103, p. 7399-7423, 2019.

GHAFFAR, F.; SAPAWE, N.; JEMAIN, E. D.; ALIKASTURI, A. S.; MASRIPAN, N. Study on The potential of waste cockle shell derived calcium oxide for biolubricant production. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 19, p. 1346-1353, 2019.

GRECO-DUARTE, J.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DA SILVA, J. A. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. **Fuel**, [Netherlands], v. 202, p. 196-205, 2017.

GUPTA, J.; AGARWAL, M.; DALAI, A. K. An overview on the recent advancements of sustainable heterogeneous catalysts and prominent continuous reactor for biodiesel production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [South Korea], v. 88, p. 58-77, 2020.

HEIKAL, E. K.; ELMELAWY, M. S.; KHALIL, S. A.; ELBASUNY, N. M. Manufacturing of environment friendly biolubricants from vegetable oils. **Egyptian Journal of Petroleum**, [Egypt], v. 26, p. 53-59, 2017.

HO, C. K.; MCAULEY, K. B.; PEPPLEY, B. A. Biolubricants through renewable hydrocarbons: A perspective for new opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [Netherlands], v. 113, p. 109261, 2019.

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

ISMAIL, A. R.; BAEK, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Netherlands], v. 163, p. 1624-1639, 2020.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [United Kingdom], v. 132, p. 23-34, 2018.

KARMAKAR, G.; GHOSH, P.; SHARMA, B. K. Chemically modifying vegetable oils to prepare green lubricants. **Lubricants**, [s. l.], v. 5, p. 1-17, 2017.

KIM, H.; CHOI, N.; KIM, Y.; KIM, H.; LEE, J.; KIM, I. Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. **Renewable Energy**, [United Kingdom], v. 130, p. 489-494, 2019.

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

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**, Germany, v. 41, p. 991-1002, 2018.

MACHADO, N. B.; MIGUEZ, J. P.; BOLINA, I. C. A.; SALVIANO, A. B.; GOMES, R. A. B.; TAVANO, O. L.; LUIZ, J. H. H.; TARDIOLI, P. W.; CREN, E. C.; MENDES A. A. Preparation, functionalization and characterization of rice husk sílica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Tecnology**, [Netherlands], v. 128, p. 9-21, 2018.

MCNUTT, J.; HE, Q. S. Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [South Korea], v. 36, p. 1-12, 2016.

MENDOZA-ORTIZ, P. A.; GAMA, R. S.; GÓMEZ, O. C.; LUIZ, J. H. H.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Sustainable enzymatic synthesis of a solketal ester—process optimization and evaluation of its antimicrobial activity. **Catalysts**, [Switzerland], v. 10, n. 2, p. 218, 2020.

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

MONTEIRO, R. R. C.; ARANA-PEÑA, S.; ROCHA, T. N.; MIRANDA, L. P.; BERENQUER-MURCIA, A.; TARDIOLI, P. W.; SANTOS, J. C. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, [United Kingdom], 2020.

MULINARI, J.; OLIVEIRA, J. V.; HOTZA, D. Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. **Biotechnology Advances**, [Netherlands], v. 42, p. 107581, 2020.

NOGALES-DELGADO, S.; SÁNCHEZ, N.; ENCINA, J. M. Valorization of *Cynara Cardunculus* L. oil as the basis of a biorefinery for biodiesel and biolubricant production. **Energies**, [Switzerland], v. 13, p. 5085, 2020.

OKURA, N. S.; SABI, G. J.; CRIVELLENTI, M. C.; GOMES, R. A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Netherlands], v. 163, p. 550-561, 2020.

PANCHAL, T. M.; PATEL, A.; CHAUHAN, D. D.; THOMAS, M.; PATEL, J. V. A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [Netherlands], v.70, p. 65-70, 2017.

PAPADAKI, A.; FERNANDES, K. V.; CHATZIFRAGKOU, A.; AGUIEIRAS, E. C. G.; DA SILVA, J. A. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PAPANIKOLAOU, S.; KOUTINAS, A.; FREIRE, D. M. G. Bioprocess development for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. **Bioresource Technology**, [Netherlands], v. 267, p. 311-318, 2018.

PARENTE, E. J.; MARQUES, J. P. C.; RIOS, I. C.; CECILIA, J. A.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; LUNA, F. M. T.; CAVALCANTE, C. L. Production of biolubricants from soybean oil: studies for an integrated process with the current biodiesel industry. **Chemical Engineering Research and Design**, [United Kingdom], 2020.

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**, Switzerland, v. 3, p. 1-27, 2017.

REIS, C. L. B.; DE SOUSA, E. Y. A.; SERPA, J. F.; OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, J. C. S. Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **Química Nova**, Brasil, v. 42, p. 768-783, 2019.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: Immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, [Netherlands], v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

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

SARNO, M.; IULIANO, M.; CIRILLO, C. Optimized procedure for the preparation of an enzymatic nanocatalyst to produce a bio-lubricant from waste cooking oil. **Chemical Engineering Journal**, [Netherlands], v. 377, p. 120273, 2020.

SETHURAMIAH, A.; KUMAR, R. **Modeling of chemical wear: relevance to practice**. [S. I.]: Elsevier, 2016.

SHARMA, H.; UPADHYAY, S. K. Enzymes and their production strategies. *In*: SINGH, S. P.; PANDEY, A.; SINGHANIA, R. R.; LARROCHE, C.; LI, Z. **Advances in Enzyme Catalysis and Technologies**. [S. I.]: Elsevier, p. 31-48, 2020.

SHUAI, W.; DAS, R. K.; NAGHDI, M.; BRAR, S. K.; VERMA, M. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [United States], v. 64, p. 496-508, 2016.

SIGMA-ALDRICH. (2020). Catálogo de produtos. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Silica&interface=Product%20Name&N=0+&mode=mode%20matchpartialmax&lang=pt®ion=BR&focus=productN=0%20220003048%2019853286%2019853075>. Acesso em: 20 nov. 2020.

SINGH, Y.; SHARMA, A.; SINGLA, A. Non-edible vegetable oil-based feedstocks capable of bio-lubricant production for automotive sector applications - a review. **Environmental Science and Pollution Research**, Germany, v. 26, p. 14867-14882, 2019.

SYAHIR, A. Z.; ZULKIFLI, N. W. M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; ALABDULKAREM, A.; GULZAR, M.; KHUONG, L. S.; HARITH, M. H. A review on bio-based lubricants and their applications. **Journal of Cleaner Production**, [Netherlands], v. 168, p. 997-1016, 2017.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of lipases – A review. Part I: Enzyme immobilization. **ChemBioEng Reviews**, Weinheim, v. 6, p. 157-166, 2019.

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

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; PEDRERO, S. G.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; OTERO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Desorption of lipases immobilized on octyl-agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation. Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites. **Molecules**, [Switzerland], v. 22, p. 91, 2017.

WANG, W.; YE, K.; LONG, H.; RU, H. Facile preparation of hierarchically meso-mesoporous silicas with ultra-large pores and pore volumes via partitioned cooperative self-assembly process. **Materials Letters**, [Netherlands], v. 167, p. 54-57, 2016.

YANG, X.; DU, H.; LIN, Y.; SONG, L.; ZHANG, Y.; GAO, X.; KONG, C.; CHEN, L. Hybrid organosilica membrane with high CO₂ permselectivity fabricated by a two-step hot coating method. **Journal of Membrane Science**, [Netherlands], v. 506, p. 31-37, 2016.

YU, X.; TIAN, J.; XIE, H.; SHEN, H.; WANG, Q. The integrated production of microbial lipids and bio-SiO₂ from rice husks by an organic electrolytes pretreatment technology. **Bioresource Technology**, [Netherlands], v. 153, p. 403-407, 2014.

ZAINAL, N. A.; ZULKIFLI, N. W. M.; GULZAR, M.; MASJUKI, H. H. A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [Netherlands], v. 82, p. 80-102, 2018.

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

ZHAO, Z.; ZHOU, M. C.; LIU, R. L. Recent developments in carriers and non-aqueous solvents for enzyme immobilization. **Catalysts**, Switzerland, v. 9, p. 1-15, 2019.

ZHONG, L.; FENG, Y.; WANG, G.; WANG, Z.; BILAL, M.; LV, H.; JIA, S.; CUI, J. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Netherlands], v. 152, p. 207-222, 2020.

CAPÍTULO 2

Este capítulo consiste na preparação e caracterização de partículas de sílica de casca de arroz funcionalizadas com PheTES para a obtenção de um suporte hidrofóbico para a imobilização de LTL via ativação interfacial. A modificação química do suporte foi confirmada por diferentes técnicas de microscopia (MEV, TEM e MFA), análise elementar (CHN) e fisissorção de nitrogênio. As propriedades catalíticas deste biocatalisador foram testadas na hidrólise da emulsão do azeite de oliva emulsificado e síntese de oleato de cetila (éster de cera). Estes resultados foram publicados no periódico indexado *Materials Chemistry and Physics* – <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.06.002>

RESUMO

No presente estudo, partículas de sílica de casca de arroz foram produzidas e funcionalizadas com trietóxi(fenil)silano (PheTES) para o emprego na imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) por ativação interfacial. A introdução de grupos fenil na superfície do suporte foi confirmada por diferentes análises: MEV, MET, MFA e B.E.T. Os parâmetros de imobilização foram determinados pela concentração de proteína imobilizada, usando um carregamento inicial de proteína de 40 mg/g de suporte. Nestas condições, a máxima concentração de proteína imobilizada foi de $27,7 \pm 2,3$ mg/g. Além disso, a atividade catalítica do biocatalisador foi determinada empregando o método de hidrólise do azeite de oliva emulsificado, resultando em um valor de atividade de $655,6 \pm 31,9$ U/g. O biocatalisador preparado foi utilizado na síntese de oleato de cetila, um éster com propriedades emolientes, por reação de esterificação em meio isento de solvente. Após 330 minutos de reação em modo batelada, máxima conversão de 92% foi observada. Testes de reuso do biocatalisador após sucessivos ciclos de reação também foram realizados, observando total retenção da atividade inicial após consecutivos 7 ciclos de reação. Esses resultados mostram que a funcionalização da sílica de casca de arroz é uma estratégia promissora na preparação de um biocatalisador estável e ativo para a síntese de éster de interesse industrial.

Palavras-chave: Sílica de casca de arroz. Funcionalização. Caracterização. Adsorção de lipase. Éster cosmético.

2.1 INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases – EC 3. 1. 1. 3) são enzimas amplamente utilizadas na indústria, capazes de catalisar a hidrólise de óleos e gorduras em meio aquoso e a síntese de ésteres (esterificação, transesterificação e interesterificação) em meio não-aquoso (ADLERCREUTZ, 2013). O seu uso em escala industrial requer a imobilização em diferentes suportes, com a finalidade de aprimorar propriedades importantes como estabilidade em diferentes valores de pH, temperaturas e solventes orgânicos, e atividade catalítica em meios orgânicos. Além disso, a imobilização facilita a separação dos biocatalisadores dos produtos reacionais e permite seu reuso em novos ciclos de reação (ZHAO *et al.*, 2015). Diversos protocolos têm sido empregados na imobilização de lipases, como ligação covalente, adsorção física por interações hidrofóbicas ou iônicas, encapsulação ou CLEA (agregados enzimáticos reticulados) (ADLERCREUTZ, 2013; ZHAO *et al.*, 2015). A imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos, uma estratégia bastante efetiva para aumentar a atividade catalítica e estabilidade da enzima, é baseada no mecanismo de ativação interfacial, estabilização de lipases na conformação aberta em superfícies de suportes hidrofóbicos (ADLERCREUTZ, 2013; ALVES *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019; VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2015). Este processo de adsorção é reversível, o que facilita a recuperação dos mesmos e a aplicação em imobilizações subsequentes por meio da dessorção das enzimas inativas empregando tensoativos (VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017).

Diversos materiais orgânicos e inorgânicos têm sido utilizados na imobilização de lipases por ativação interfacial (ADLERCREUTZ, 2013; ALVES *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019; VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2015; ZUCCA, SANJUST; 2014). Suportes à base de sílica têm despertado grande interesse devido às suas propriedades tais como estabilidade mecânica, alta resistência térmica e elevada área superficial e diâmetro de poro (VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017). Estes materiais têm sido funcionalizados com diversos agentes silanos ou líquidos iônicos a fim de criar um microambiente hidrofóbico e reduzir a possibilidade de interações indesejáveis das lipases com a superfície dos suportes que podem distorcer suas estruturas tridimensionais (BERNAL *et al.*, 2017; BLANCO *et al.*, 2004; BOLINA *et al.*, 2018; LISBOA *et al.*,

2018; MACHADO *et al.*, 2018; MIGUEZ *et al.*, 2018; VESCOVI *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2017). As partículas de sílica comerciais ou preparadas por meio de técnicas de sol-gel usando vários precursores silanos têm sido comumente usadas para preparar suportes hidrofóbicos (BERNAL *et al.*, 2017; BLANCO *et al.*, 2004; LISBOA *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2018; VESCOVI *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2017). Neste estudo, o suporte foi preparado usando casca de arroz como fonte de sílica. Visando uma possível melhora na capacidade de adsorção da lipase e, conseqüentemente, na atividade catalítica na reação de esterificação, este material foi funcionalizado com PheTES para obtenção de um novo suporte hidrofóbico (Fenil-SiO₂). Estudos anteriores na literatura mostram o uso promissor de suportes à base de sílica funcionalizados com grupos fenil para imobilizar lipases e seu uso como biocatalisadores na hidrólise de ésteres (BERNAL *et al.*, 2017) e em reações de transesterificação (ZHENG *et al.*, 2017). Neste estudo, LTL foi usado como modelo de enzima devido à sua alta atividade catalítica em meios aquosos e não aquosos (ALVES *et al.*, 2017; BOLINA *et al.*, 2018; LIMA; PERES; MENDES, 2018; MACHADO *et al.*, 2018; MIGUEZ *et al.*, 2018). O biocatalisador heterogêneo preparado foi utilizado para a síntese de oleato de cetila, um éster emoliente com algumas propriedades físico-químicas muito semelhantes ao óleo de jojoba (LIMA, PERES, MENDES, 2018), via esterificação direta de ácido oleico e álcool cetílico em um meio isento de solvente.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi comprada da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Casca do arroz foi adquirida da empresa Arroz Rei de Ouro Ltda. (Itajubá, MG, Brasil). Trietóxi(fenil)silano e álcool cetílico foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Azeite de oliva (Carbonel) foi adquirido em mercado local (Alfenas, MG, Brasil). Albumina sérica bovina foi adquirida da Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA). Goma arábica foi comprada da Synth[®]. Os demais produtos químicos e solventes orgânicos foram de grau analítico adquiridos da Synth[®] e Vetec Quimica Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

2.2.2 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 armazenadas em estufa por 15 h a 80°C. 30 g de cascas de arroz secas foram incubadas sob refluxo em 400 mL de solução aquosa de HCl (35% m/m) na proporção de 9:1 de água destilada e ácido, respectivamente, por 2 h a 120°C. Em seguida, elas foram filtradas, lavadas exaustivamente com água destilada e calcinadas em forno mufla a 700°C por 4 h para a obtenção de SiO₂ (sílica), com um rendimento mássico médio de 11% em relação à massa total das cascas.

2.2.3 Funcionalização das partículas de sílica com trietoxi (fenil) silano

A preparação de Fenil-SiO₂ foi realizada segundo a metodologia descrita por Vescovi *et al.* (2016). Uma suspensão contendo 1 g de SiO₂ e 20 mL de uma mistura de precursor de silano e tolueno (na proporção volumétrica silano:tolueno de 1:10) foi mantida sob refluxo por 4 h a 120°C. O suporte funcionalizado foi filtrado em um funil de Buchner à vácuo, usando papel de filtro Whatman nº 41, e lavado com acetona, etanol e água destilada. Após a lavagem, o suporte foi mantido a 40°C por 24 h em estufa de secagem.

2.2.4 Caracterização das partículas de sílica

As imagens de MEV foram capturadas em um equipamento Quanta 200 FEI sob vácuo, com tensão de 5 kV, enquanto as imagens de MET foram obtidas pelo equipamento Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI, com voltagem de aceleração de 120 kV. A área superficial foi determinada pela fisissorção de N₂ a 77 K, usando o método de Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.) em um equipamento LMAcorp. O modelo de Barrett–Joyner–Halenda (BJH) foi aplicado para determinar o tamanho médio e volume do poro. As imagens de MFA foram obtidas usando um microscópio Cypher ES (Asylum Research), com uma área superficial de 1x1 µm. A densidade dos grupos funcionais foi determinada por análises elementares utilizando um PerkinElmer CHN 2400.

2.2.5 Procedimento de imobilização de lipases via adsorção hidrofóbica

A imobilização de LTL em Fenil-SiO₂ foi realizada de acordo com estudos anteriores realizados em nosso grupo (ALVES *et al.*, 2017; MIRANDA *et al.*, 2014). O procedimento de adsorção consistiu na preparação de uma suspensão contendo solução LTL (previamente preparada com solução tampão) e suporte na proporção de 1:20 (m/v) (suporte/solução de LTL). A suspensão foi mantida sob agitação de 200 rpm em um agitador orbital. O biocatalisador preparado foi filtrado sob vácuo em funil de Buchner com papel filtro Whatman n° 41 e lavado exaustivamente com água destilada. O processo de adsorção foi monitorado pela determinação da concentração de proteína desaparecida no sobrenadante de imobilização. Após, o biocatalisador preparado foi estocado a 4°C por 24 h.

2.2.6 Determinação dos parâmetros de imobilização

A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford com Albumina de Soro Bovina como padrão (BRADFORD, 1976). A concentração de proteína imobilizada num certo tempo t de incubação (q_t – mg/g de suporte) foi determinada segundo a Eq. (1) (ALVES *et al.*, 2017):

$$q_t = \frac{V \times (C_0 - C_e)}{m} \quad (1)$$

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 de LTL imobilizada foi baseado na hidrólise da emulsão do óleo de oliva (ALVES *et al.* 2016, 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 adicionada em frascos Erlenmeyer de 125 mL e incubados em um agitador de banho convencional com controle de temperatura (37°C) a 200 rpm. 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. (2). Uma unidade internacional (U) 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.

$$AH(U/g) = \frac{(V_s - V_c) \times M \times 10^3}{t \times m} \quad (2)$$

Em que: AH é a atividade hidrolítica (U/g biocatalisador); V_s é o volume de NaOH utilizado para titular a amostra (mL); V_c é o volume de NaOH utilizado para titular a amostra controle (mL); M é a concentração molar da 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. (3):

$$AE = \frac{AH}{q_e} \quad (3)$$

Em que: AH é a atividade hidrolítica aparente do biocatalisador preparado (U/g); q_e é a concentração de proteína imobilizada no equilíbrio (mg/ g suporte).

2.2.7 Síntese enzimática de ésteres por esterificação em meio isento de solventes

O biocatalisador preparado foi utilizado para a síntese em batelada de oleato de cetila por esterificação direta do ácido oleico e álcool cetílico em meio isento de solvente. A esterificação foi realizada conforme a metodologia descrita por Miguez *et al.* (2018), com algumas modificações. As reações foram conduzidas em frascos fechados (frascos de Durán) de 100 mL contendo 6 g de meio reacional contendo razão equimolar de ácido oleico e álcool cetílico (1:1). A mistura reacional foi incubada em shaker rotativo (240 rpm) a 50°C e concentração de catalisador de 10% m/v de mistura de reação. Alíquotas do meio de reação foram retiradas em tempos pré-determinados e diluídas em mistura etanol:acetona (1:1) para a quantificação de ácido graxo residual por titulação com solução de NaOH 30 mM. A porcentagem de conversão foi determinada de acordo com a Eq. (4) (MIGUEZ *et al.*,

2018).

$$\text{Convers\~{a}o}(\%) = \left(\frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Em que: A_{inicial} e A_{final} s\~{a}o as concentra\~{c}o\~{e}s de \~{a}cido oleico inicial e final no meio reacional (mM), respectivamente.

2.2.8 Testes de reuso do biocatalisador

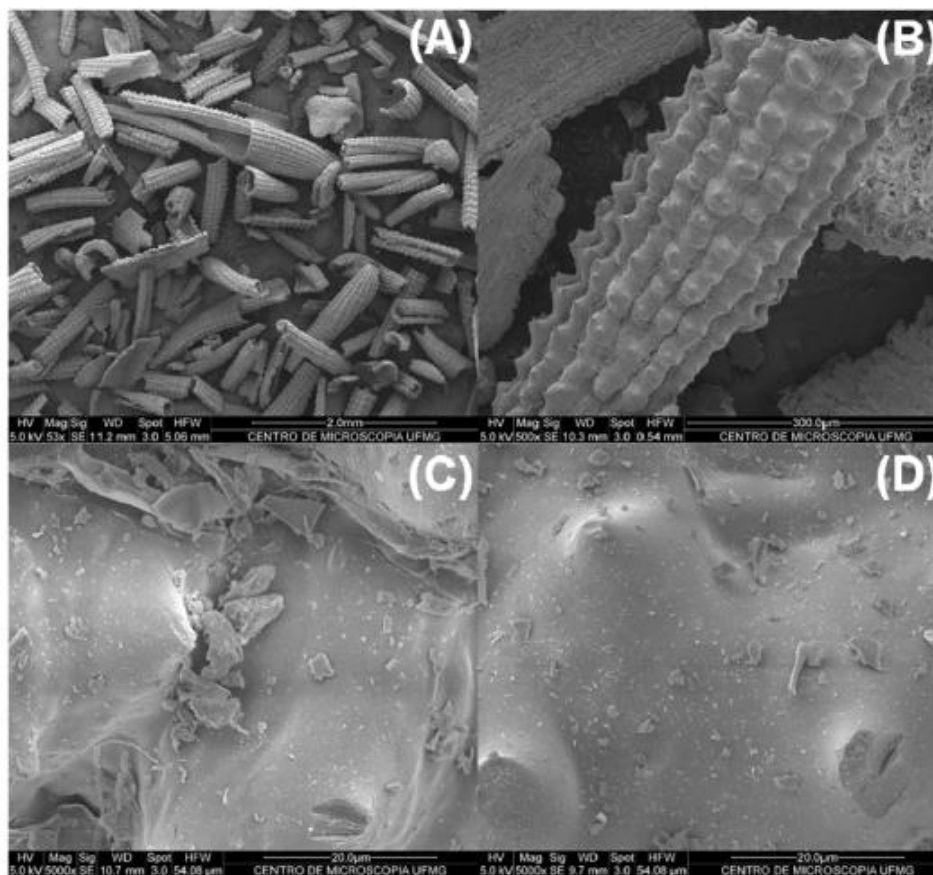
Neste estudo, testes de reuso do biocatalisador preparado foi analisada para a s\~{i}ntese de oleato de cetila em sistemas de bateladas consecutivas. Ao final de cada batelada (7 sucessivos ciclos de rea\~{c}o\~{e} nas condi\~{c}o\~{e}s experimentais descritas acima), o biocatalisador foi removido do meio reacional e lavado com hexano \~{a} frio para a remo\~{c}o\~{e} de substratos n\~{a}o convertidos ou produtos retidos no biocatalisador. Em seguida, ele foi adicionado em um novo substrato, no qual foi estimada a porcentagem de convers\~{a}o (MIGUEZ *et al.*, 2018).

2.3 RESULTADOS E DISCUSS\~{A}O

2.3.1 Caracteriza\~{c}o\~{e} das part\~{i}culas de s\~{i}lica

S\~{i}lica de casca de arroz funcionalizada com grupos fenil foi caracterizada por diversas t\~{e}cnicas e os resultados foram comparados com a s\~{i}lica de casca de arroz n\~{a}o-funcionalizada. As imagens de Microscopia Eletr\~{o}nica de Varredura (MEV) das part\~{i}culas de s\~{i}lica funcionalizadas e n\~{a}o-funcionalizadas, s\~{a}o mostradas na Figura 8. Como pode ser observado, o suporte testado possui uma distribui\~{c}o\~{e} de tamanho que varia de 80 a 450 μm , aproximadamente, com uma forma irregular.

Figura 8 - Imagens de MEV da sílica não-funcionalizada e fenil-funcionalizada

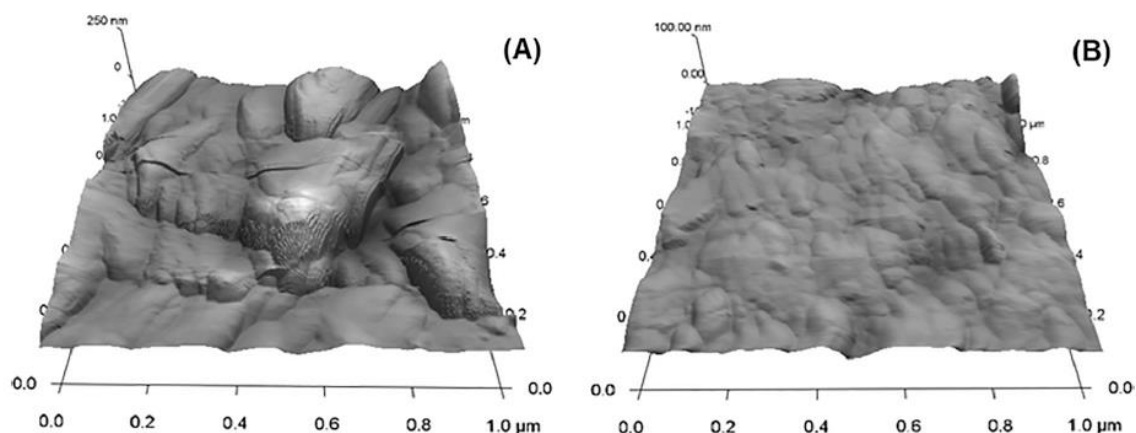


Fonte: do autor.

- Legenda:
- (A) SiO_2 (ampliação de 53x)
 - (B) SiO_2 (ampliação de 500x)
 - (C) SiO_2 (ampliação de 5000x)
 - (D) Fenil- SiO_2 (ampliação de 5000x)

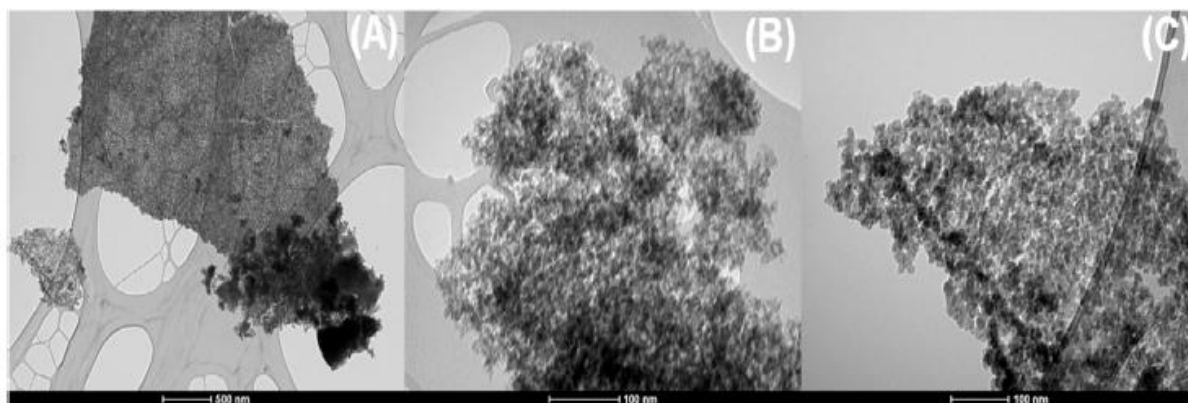
A funcionalização com PheTES levou à formação de uma superfície mais homogênea, como mostrado na Figura 8d. As imagens de Microscopia de Força Atômica (MFA) para ambas partículas são mostradas na Figura 9. É possível observar que a rugosidade média é maior nas partículas não-funcionalizadas do que no suporte funcionalizado, 32,5 nm e 5,9 nm, respectivamente. Esses resultados, assim como os resultados da MEV, mostram que a funcionalização torna a superfície do suporte mais regular. Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Figura 10) também mostraram um decréscimo da rugosidade e do tamanho de poro da sílica após a funcionalização, estando de acordo com as análises descritas acima.

Figura 9 - Imagens de MFA da sílica não-funcionalizada (A) e funcionalizada com PheTES (B)



Fonte: do autor.

Figura 10 - Imagens de MET da sílica não-funcionalizada (A e B) e Fenil-SiO₂ (C)



Fonte: do autor.

Essas análises confirmam a introdução dos grupamentos hidrofóbicos (fenil) na superfície do suporte, que levam a diminuição da rugosidade e do tamanho do poro na sílica. A análise elemental mostrou que a densidade de grupos fenil na superfície do suporte foi de aproximadamente 89 μmol por grama de suporte. A área superficial e porosidade do suporte funcionalizado e não-funcionalizado foi determinada pelo método de B.E.T. Os resultados mostraram um decréscimo na área superficial (de 222,1 m^2/g para 183,7 m^2/g) e volume de poro (de 0,383 cm^3/g para 0,292 cm^3/g) após a funcionalização, devido à inserção dos grupos fenil na superfície do suporte, como mencionado acima. Entretanto, o diâmetro de poro

médio das partículas funcionalizadas e não-funcionalizadas foram 36,3 e 35,2 Å, respectivamente. Em ambos os casos, a adsorção da LTL ocorre preferencialmente na superfície externa do suporte, devido ao maior diâmetro molecular da lipase (53,2 Å) (ALVES *et al.*, 2017). Isso indica que ambas as reações onde o biocatalisador foi aplicado (hidrólise e esterificação) podem ser controladas pela transferência de massa externa. Por esse motivo, as reações foram realizadas em agitação contínua de 240 rpm, a fim de minimizar possíveis limitações no processo de transferência de massa na superfície externa do biocatalisador.

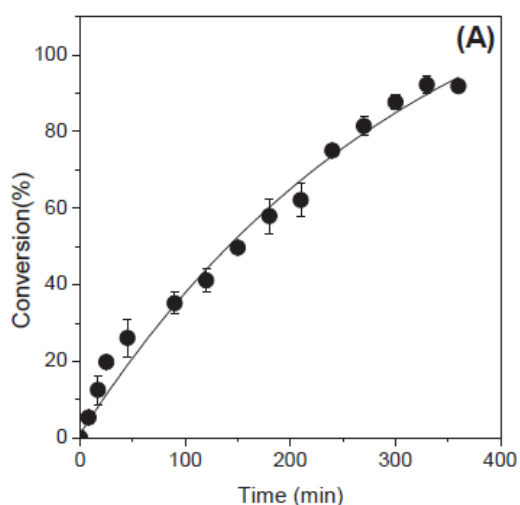
2.3.2 Caracterização do biocatalisador preparado por adsorção

A sílica de casca de arroz funcionalizada com PheTES foi testada como suporte para a imobilização da LTL a fim de se obter um biocatalisador ativo e estável em reações de síntese de oleato de cetila por esterificação. A imobilização da lipase ocorreu pela interação dos grupos fenil inseridos na superfície do suporte com as regiões hidrofóbicas próximas ao sítio-ativo da enzima – mecanismo de ativação interfacial das lipases (ADLERCREUTZ, 2013; ALVES *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2019; VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2015). Estudos anteriores mostraram que a introdução de grupamentos hidrofóbicos na superfície do suporte aumenta consideravelmente a capacidade de adsorção das lipases. O microambiente hidrofóbico aumenta a afinidade da enzima pelo suporte, além de solubilizar os reagentes hidrofóbicos (ex.: ácidos graxos, álcoois de cadeia longa), produzindo biocatalisadores com alta atividade catalítica em reações em meio não-aquoso (BERNAL *et al.*, 2017; BLANCO *et al.*, 2004; LISBOA *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2017). Por esse motivo, partículas de sílica não funcionalizadas não foram empregadas neste estudo para a preparação de biocatalisadores heterogêneos porque a sua capacidade de adsorção de lipases é menor se comparada aos suportes funcionalizados (MACHADO *et al.*, 2018). Neste estudo, o biocatalisador foi preparado com um carregamento inicial de proteína de 40 mg/g, conforme estudos anteriores realizados em nosso laboratório, onde foram empregados diversos grupamentos silanos para o preparo do suporte (BOLINA *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2018; MIGUEZ *et al.*, 2018; VESCOVI *et al.*, 2016). Os resultados mostraram uma concentração máxima de proteína imobilizada de $27,7 \pm 2,3$ mg/g. Essa concentração é maior do que as reportadas em outros estudos, nos

quais se imobilizou LTL em suportes de sílica de casca de arroz funcionalizados com octil – $21,9 \pm 0,1$ mg/g (MACHADO *et al.*, 2018), e sequencial funcionalização com (3-Glicidóxiopropil)trimetóxisilano (GPTMS) e ativação com glicina – ~ 15 mg/g (BOLINA *et al.*, 2018).

A atividade hidrolítica do biocatalisador preparado foi de $655,6 \pm 31,9$ U/g, valor que é quase o dobro da atividade observada para aquele preparado com sílica funcionalizada com grupos epóxi e glicina – entre $307,4 \pm 7,2$ U/g e $357,6 \pm 11,2$ U/g (BOLINA *et al.*, 2018), e quase o triplo do observado em partículas de casca de arroz ativadas com glutaraldeído – $210,3 \pm 19,4$ U/g (LIMA *et al.*, 2018). A atividade catalítica do biocatalisador também foi determinada pela síntese do oleato de cetila. Como pode ser observado na Figura 11, obteve-se uma conversão máxima de 92% em 330 minutos de reação.

Figura 11 - Efeito do tempo de reação na síntese do oleato de cetila, catalisada por LTL imobilizada em Fenil-SiO₂



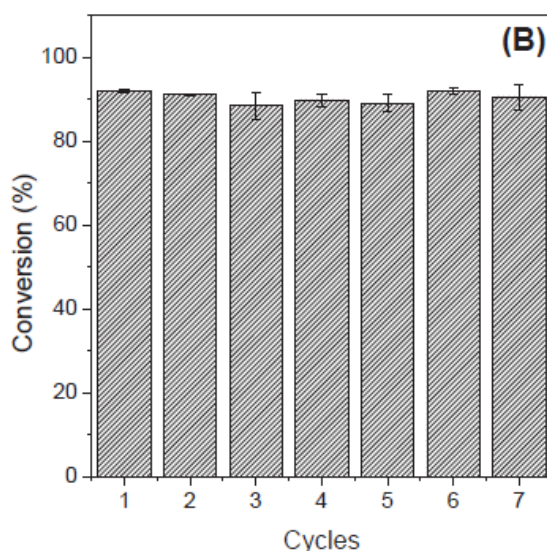
Fonte: do autor.

2.3.3 Testes de reuso

Testes de reuso mostraram que o biocatalisador preparado reteve toda a atividade original após 7 ciclos sucessivos de reação em um sistema batelada (Figura 12), indicando a forte interação e estabilização da estrutura tridimensional da LTL na superfície do suporte funcionalizado (BOLINA *et al.*, 2018; LISBOA *et al.*, 2018). Esses resultados evidenciam o uso promissor do Fenil-SiO₂ como suporte

para o preparo de um biocatalisador com alta atividade catalítica e capacidade de reuso.

Figura 12 - Testes de reuso do biocatalisador preparado pela imobilização de LTL em Fenil-SiO₂, na síntese de oleato de cetila em meio isento de solvente



Fonte: do autor.

2.4 CONCLUSÃO

O suporte de sílica funcionalizado (Fenil-SiO₂) foi preparado e utilizado com êxito na imobilização de LTL por ativação interfacial. A introdução dos grupos fenil na superfície da sílica de casca de arroz produziu um biocatalisador com alta concentração de proteína adsorvida e alta atividade catalítica, tanto para as reações de hidrólise quanto para esterificação. Foi também observada uma alta estabilização da estrutura tridimensional da enzima, pois o biocatalisador foi altamente ativo após 7 ciclos sucessivos de reação em um meio isento de solvente. Esses resultados mostram que o suporte preparado possui um enorme potencial para o preparo de biocatalisadores ativos e estáveis na síntese de ésteres e, por esta razão, o biocatalisador preparado foi utilizado na síntese de biolubrificantes.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases inorganic media. **Chemical Society Reviews**, [United Kingdom], v. 42, p. 6406-6436, 2013.
- ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, [Netherlands], v. 311, p. 1-12, 2017.
- ALVES, M. D.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [Netherlands], v. 133, n. 1, p. S377-S387, 2016.
- BERNAL, C.; ILLANES, A.; WILSON, L. Improvement of efficiency in the enzymatic synthesis of lactulose palmitate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [United States], v. 63, p. 3716-3724, 2015.
- BEZERRA, C. S.; LEMOS, C. M. G. F.; SOUSA, M.; GONÇALVES, L. R. B. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, [United States], v. 132, p. 42125-42139, 2015.
- BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [Netherlands], v. 30, n. 2, p. 83-93, 2004.
- BOLINA, I. C. A.; SALVIANO, A. B.; TARDIOLI, P. W.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO₂ with glycine to immobilize microbial lipase – Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, [Netherlands], v. 120, p. 2354-2365, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [United States], v. 72, p. 248-254, 1976.
- GAMA, R. S.; BOLINA, I. C. A.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. A novel functionalized SiO₂-based support prepared from biomass waste for lipase adsorption. **Materials Chemistry and Physics**, [Netherlands], v. 234, p. 146-150, 2019.
- 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**, Germany, v. 41, p. 991-1002, 2018.
- LISBOA, M. C.; RODRIGUES, C. A.; BARBOSA, A. S.; MATTEDI, S.; FREITAS, S.;

MENDES, A. A.; DARIVA, C.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. New perspectives on the modification of silica aerogel particles with ionic liquid used in lipase immobilization with platform in ethyl esters production. **Process Biochemistry**, [United Kingdom], v. 75, p. 157-165, 2018.

MACHADO, N. B.; MIGUEZ, J. P.; BOLINA, I. C. A.; SALVIANO, A. B.; GOMES, R. A. B.; TAVANO, O. L.; LUIZ, J. H. H.; TARDIOLI, P. W.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Technology**, [Netherlands], v. 128, p. 9-21, 2018.

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

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

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENQUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: Immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, [Netherlands], v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

VESCOVI, V.; KOPP, W.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multiattached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional aminoglutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, [United Kingdom], v. 51, n. 12, p. 2055-2066, 2016.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; PEDRERO, S. G.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; OTERO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Desorption of lipases immobilized on octyl-agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation. Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites. **Molecules**, [Switzerland], v. 22, p. 91, 2017.

ZEMNUKHOVA, L. A.; PANASENKO, A. E.; TSOI, E. A.; FEDORISHCHEVA, G. A.; SHAPKIN, N. P.; ARTEM'YANOV, A. P.; MAIOROVA, V. Y. Composition and structure of amorphous silica produced from rice husk and straw. **Inorganic Materials**, [Russian Federation], v. 50, p. 75-81, 2014.

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

ZHAO, D.; PENG, C.; ZHOU, J. Lipase adsorption on different nanomaterials: a multi-scale simulation study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [United Kingdom], v. 17, p. 840-850, 2015.

ZHENG, M.; XIANG, X.; WANG, S.; SHI, J.; DENG, Q.; HUANG, F.; CONG, R. Lipase immobilized in ordered mesoporous silica: a powerful biocatalyst for ultrafast kinetic resolution of racemic secondary alcohols. **Process Biochemistry**, [United Kingdom], v. 53, p. 102-108, 2017.

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

CAPÍTULO 3

“Produção de biolubrificantes catalisada por lipase imobilizada em sílica de casca de arroz funcionalizada”, trabalho completo publicado nos anais do XX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação.

3.1 INTRODUÇÃO

Os lubrificantes são compostos frequentemente utilizados na indústria com intuito de minimizar o atrito e desgaste entre as peças dos maquinários. Estima-se que cerca de 30 a 40 milhões de toneladas de lubrificantes são utilizadas anualmente e aproximadamente 55% são descartados no meio ambiente incorretamente. Atualmente, cerca de 95% dos lubrificantes comercializados são à base de petróleo (SYAHIR *et al.*, 2017). Portanto, o uso desses produtos, além de causar risco a saúde humana, é responsável também pela contaminação do ar, solo e corpos d'água, quando descartados indevidamente (CECILIA *et al.*, 2020; SYAHIR *et al.*, 2017). Os lubrificantes obtidos a partir de biomassa (biolubrificantes) surgiram como uma alternativa aos lubrificantes de origem mineral, pois eles possuem menor toxicidade e degradam mais rapidamente no meio ambiente (SYAHIR *et al.*, 2017).

A síntese de biolubrificantes emprega normalmente catalisadores químicos homogêneos, como ácidos minerais (HCl, H₂SO₄ ou H₃PO₄) e bases fortes (NaOH e KOH). Entretanto, esta rota apresenta desvantagens como difícil regeneração, alto consumo de energia e geração de grandes volumes de resíduos líquidos nas etapas de purificação dos ésteres (CECILIA *et al.*, 2020). Portanto, a substituição por biocatalisadores (lipases) é uma alternativa promissora na produção de ésteres devido ao requerimento de condições brandas de reação (temperaturas moderadas e pressão atmosférica) e à crescente demanda por produtos ambientalmente sustentáveis (LAGE *et al.*, 2016).

No entanto, a aplicação de lipases na forma livre (líquida ou em pó) em processos industriais não é vantajosa devido ao seu elevado custo, sensibilidade a altas temperaturas, pH e meios orgânicos e à sua difícil separação do meio de reação, limitando a sua recuperação e reutilização ao final do processo (FILHO *et al.*, 2019). Com a finalidade de superar estas desvantagens, lipases imobilizadas em suportes sólidos têm sido amplamente empregadas na produção de ésteres industriais a partir de triacilgliceróis (óleos vegetais, gorduras animais e óleos residuais).

Neste estudo, lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi imobilizada por adsorção física via interações hidrofóbicas em dois suportes preparados por funcionalização de sílica de casca de arroz (Fenil-SiO₂ e Octil-SiO₂) e usada na síntese de biolubrificantes. Estes compostos foram obtidos por esterificação de

ácidos graxos livres (AGL) de óleo de soja refinado ou de fritura com decanol em meio isento de solvente. Testes de reuso dos biocatalisadores mais ativos foram realizados após 16 bateladas sucessivas de reações de esterificação.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi comprada da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lipase de *Candida rugosa* tipo VII (LCR), uma preparação de lipase comercial com atividade de 16.200 U/g de pó, foi adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Casca do arroz foi adquirida da empresa Arroz Rei de Ouro Ltda. (Itajubá, MG, Brasil). Trietoxi(octil)silano, trietoxi(fenil)silano e decanol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Azeite de oliva (Carbonel) e óleo de soja refinado (baixa acidez – Liza) foram adquiridos em mercado local (Alfenas, MG, Brasil). Óleo de fritura foi obtido na preparação de batatas fritas em um restaurante de fast food em Alfenas, MG. Albumina sérica bovina foi adquirida da Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA). Goma arábica foi comprada da Synth[®]. Demais produtos químicos e solventes orgânicos de grau analítico foram adquiridos da Synth[®] e Vetec Química Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

3.2.2 Preparo dos biocatalisadores Fenil-SiO₂ e Octil-SiO₂

O preparo da sílica foi realizado através do tratamento hidrotérmico da casca de arroz, conforme a metodologia descrita no Capítulo 2, no item 2.2. As partículas de sílica foram funcionalizadas com grupamentos octil e fenil para a produção de suportes hidrofóbicos utilizados na imobilização de LTL. O processo de funcionalização foi realizado através da metodologia também descrita no Capítulo 2, no item 2.3. O suporte preparado foi utilizado na imobilização de LTL (Capítulo 2 – item 2.4 e 2.5), resultando nos biocatalisadores empregados nas reações de esterificação para a obtenção de biolubrificantes.

3.2.3 Obtenção dos ácidos graxos livres a partir da hidrólise do óleo de soja

A obtenção dos AGL provenientes tanto do óleo de soja refinado, como também do óleo de fritura, foi realizada conforme metodologia estabelecida previamente em nosso grupo de pesquisa. Aproximadamente 0,0818 g (2500 U) de LCR foram utilizados para promover a hidrólise do óleo de soja. O meio reacional consistia em uma mistura de óleo e água na proporção de 40%(m/m), para o óleo de fritura, e de 50%(m/m), para o óleo de soja refinado. Ambas as reações ocorreram em frasco aberto, com uma agitação de 1500 rpm, a 40°C. Os tempos de reação para o óleo refinado e de fritura foram 210 e 180 minutos, respectivamente. Foram retiradas alíquotas de 1 mL dos meios reacionais, que foram adicionadas a 10 mL de etanol para a determinação da acidez residual por titulação com NaOH 0,030 M. O cálculo para a porcentagem de conversão dos triacilgliceróis em ácidos graxos é dado pela Eq. (4):

$$\text{Conversão} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times 10^{-3} \times M_{\text{NaOH}} \times MM_{\text{AGL}}}{m_{\text{amostra}} \times f_{\text{OSR}}} \times 100 \quad (4)$$

Em que: V_{NaOH} é o volume de solução de NaOH necessário durante a titulação (mL), M_{NaOH} é a concentração de NaOH (30 mmol / L), MM_{AGL} é a massa molecular média dos ácidos graxos do óleo de soja (278,6 g / mol), m_{amostra} é a massa da amostra (1 g) e f_{OSR} é a fração mássica do óleo no início da reação ($f = 0,5$ para o óleo refinado e $f = 0,4$ para o óleo de fritura).

O produto da reação foi extraído através de uma partição com água quente, para retirar o resíduo de glicerol e tratado com sulfato de sódio anidro, para a remoção completa do resíduo de água. Os AGL obtidos foram mantidos em frasco fechado, à 4°C, até a utilização nas esterificações.

3.2.4 Síntese enzimática de biolubrificante por esterificação em meio isento de solvente

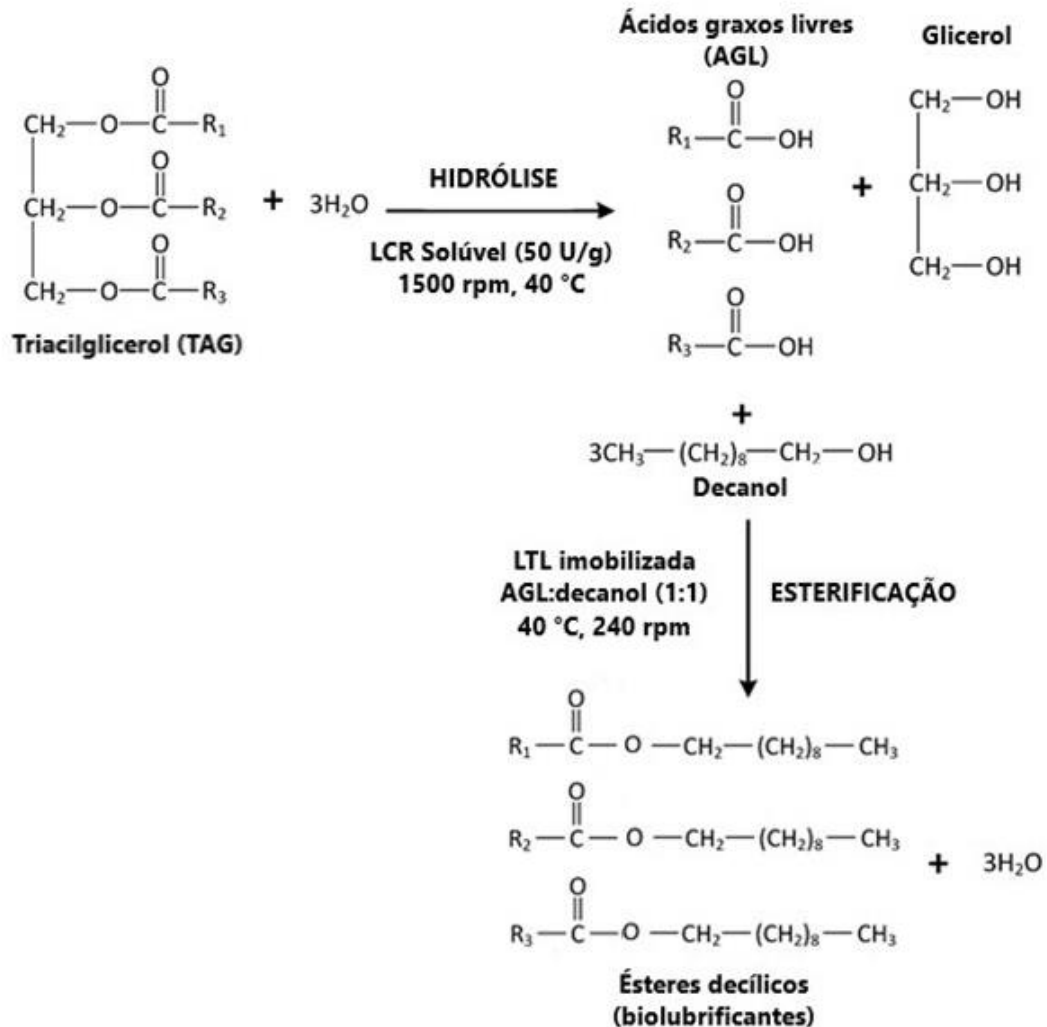
O biocatalisador preparado foi utilizado para a síntese em batelada do biolubrificante por esterificação direta dos AGL obtidos anteriormente e decanol, em meio isento de solvente. A esterificação foi realizada conforme a metodologia descrita por Miguez *et al.* (2018), com algumas modificações. As reações foram

conduzidas em frascos fechados (frascos de Durán) de 100 mL contendo 8 g de meio reacional (AGL e decanol na razão molar de 1:1). A mistura reacional foi incubada em shaker rotativo (240 rpm) a 40 °C utilizando 1,8 g e 1,45 g de biocatalisador, para as reações catalisadas por LTL-Octil-SiO₂ e LTL-Fenil-SiO₂, respectivamente (equivalente a uma concentração enzimática de 40 mg/g de suporte). Alíquotas do meio de reação foram retiradas em tempos pré-determinados e diluídas em mistura etanol:acetona (1:1) para a quantificação de ácido residual por titulação com solução de NaOH 30 mM. A conversão em ésteres foi determinada de acordo com a Eq. (5) (MIGUEZ *et al.*, 2018). A Figura 13 é uma representação esquemática de produção de AGL livres por hidrólise enzimática e produção dos biolubrificantes por esterificação dos AGL obtidos com decanol em meio isento de solventes orgânicos.

$$Convers\tilde{a}o(\%) = \left(\frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Em que: $A_{inicial}$ e A_{final} são as concentrações de ácido graxo inicial e final no meio reacional (mM), respectivamente.

Figura 13 - Esquema de obtenção dos biolubrificantes por hidroesterificação enzimática dos óleos de soja e fritura



Fonte: do autor.

3.2.5 Testes de reuso

Testes de reuso do biocatalisador selecionado (LTL imobilizada em Octil-SiO₂) foram realizados na síntese do biolubrificantes por esterificação de AGL dos óleos de soja e fritura com decanol em meio isento de solventes, conforme descritos acima, em sistemas de bateladas consecutivas. Ao final de cada batelada (16 ciclos de reação), o biocatalisador foi removido do meio reacional e lavado com hexano a frio para a remoção de substratos não convertidos ou produtos retidos no biocatalisador. Em seguida, ele foi adicionado em um novo substrato, no qual foi estimada a

conversão dos ésteres (MIGUEZ *et al.*, 2018). O produto de reação recuperado foi armazenado em frasco fechado a 4°C, para posterior purificação do éster e análise por RMN.

3.2.6 *Extração do éster por SPE*

A extração do éster preparado foi realizada por meio da técnica de Extração em Fase sólida (EFS), conforme metodologia descrita por Andersen (2010), com algumas modificações. Para o fracionamento da amostra foi usado um cartucho da marca Waters Sep-Pak® Vac 35cc de Sílica-10g, sem aplicação de pressão. O cartucho foi previamente condicionado com hexano a fim de evitar a formação de canais preferenciais ao longo da eluição. Cerca de 400 mg do produto de reação foram solubilizados em 1 mL de hexano e, em seguida, aplicados no cartucho. O fracionamento foi realizado através da eluição por gradiente com 100 mL das seguintes fases móveis: hexano:éter dietílico (97:3 e 1:1, v/v), éter dietílico:metanol (1:1 v/v) e metanol. Após a eluição, o solvente foi evaporado com nitrogênio. A confirmação da separação do éster foi feita através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para a realização da CCD durante o processo de fracionamento foram usadas cromatofolhas 20 x 20 de sílica-gel (HPTLC Sílica-gel) sobre alumínio com indicador de ultravioleta F₂₅₄. Os materiais de partida (AGL e decanol) bem como as frações obtidas foram aplicados nas cromatofolhas e eluídos com uma mistura de heptano, éter dietílico e ácido acético glacial na proporção 70:30:1 (v/v/v). As cromatoplasmas foram reveladas por exposição à radiação UV 254 nm.

3.2.7 *Caracterização dos biolubrificantes por RMN*

A caracterização do éster foi realizada por meio da técnica de RMN. Os espectros de RMN 1D (¹H, ¹³C) foram registrados no equipamento Bruker AC 300 (300 MHz para ¹H) utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e o CDCl₃ foi usado como solvente deuterado.

3.2.8 *Análise de viscosidade dos biolubrificantes*

As propriedades físico-químicas das matérias-primas e dos ésteres produzidos, como viscosidade cinemática a 40°C e 100°C (ASTM D445), índice de viscosidade (ASTM D2270) e massa específica (ASTM D891), foram determinadas seguindo ASTM métodos padrão (ASTM, 2005).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Determinação dos parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram determinados com a finalidade de avaliar a capacidade catalítica dos biocatalisadores, bem como sua eficiência e estabilidade após diversos ciclos de reação. No presente estudo, a determinação da concentração de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976). Os resultados da quantidade de proteína imobilizada em ambos os suportes estão presentes na Tabela 2. A quantidade de proteína imobilizada na Fenil-SiO₂ (27,7 ± 2,3 mg/g de suporte) foi maior que na Octil-SiO₂ (21,9 ± 0,1 mg/g de suporte) devido a maior densidade de grupos funcionais presentes na superfície do primeiro biocatalisador (89 μmoles/g), que permite um maior número de sítios de adsorção entre a enzima e a superfície do suporte.

Tabela 2 - Parâmetros de imobilização dos biocatalisadores preparados.

Parâmetros	Fenil ^a	Octil ^b
Proteína imobilizada (mg/g)	27,7 ± 2,3	21,9 ± 0,1
Atividade hidrolítica (U/g)	655,6 ± 31,9	561,4 ± 6,9
Atividade específica (U/mg)	23,7 ± 2,3	25,6 ± 2,4

Fonte: do autor.

Nota: dados do autor (a) e dados obtidos por MACHADO *et al.* (2018) (b).

Os valores de atividade hidrolítica foram obtidos através do método do azeite de oliva emulsificado e combinados com a quantidade de proteína imobilizada para se obter a atividade específica de cada biocatalisador. Os resultados também estão dispostos na Tabela 2. O biocatalisador preparado através da imobilização da LTL em Fenil- SiO₂ obteve maior atividade hidrolítica devido à maior quantidade de proteína imobilizada em sua superfície, capaz de promover uma quantidade maior de reações de hidrólise. Entretanto, as atividades específicas de ambos

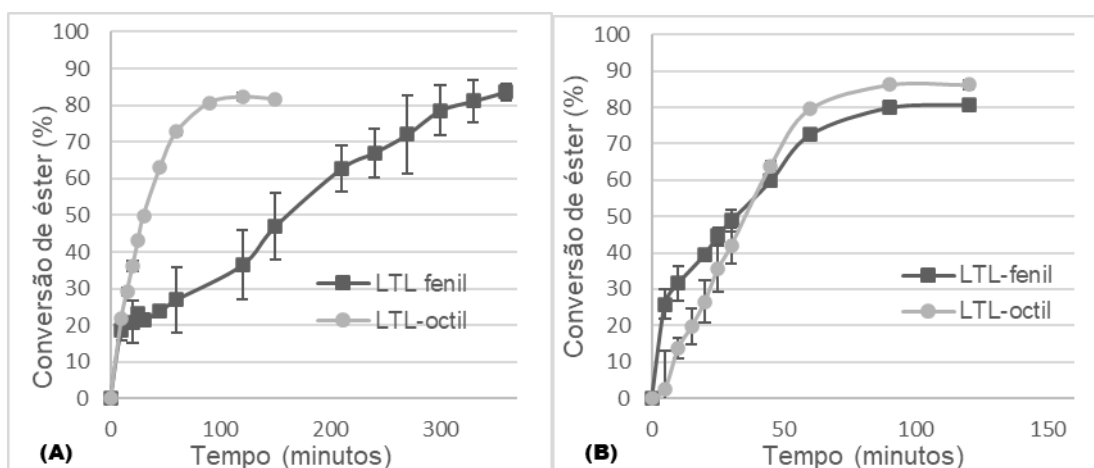
biocatalisadores são equivalentes, evidenciando que tanto a Fenil- SiO₂ quanto a Octil-SiO₂ possuem a mesma eficiência nas reações de hidrólise.

3.3.2 Síntese enzimática de biolubrificantes por esterificação em meio isento de solvente

Os biocatalisadores preparados foram utilizados na síntese de ésteres com propriedades lubrificantes, a partir dos AGL provenientes do óleo de soja refinado e do óleo de fritura com decanol, em meio isento de solvente. Nestes testes, lipase livre não foi empregada como catalisador devido à sua menor atividade em reações em meio orgânico, por grande parte das enzimas estarem preferencialmente na forma de agregados bimoleculares, que reduzem o contato de moléculas de substrato com o seu sítio ativo e pela difícil regeneração da enzima após reações consecutivas (LAGE *et al.*, 2016).

O efeito do tempo nas reações de esterificação foi analisado. Os gráficos mostrados na Figura 14 apresentam a atividade catalítica ao longo do tempo, até a reação atingir a máxima conversão.

Figura 14 - Efeito do tempo de reação na conversão enzimática de AGL do óleo de soja refinado (A) e de fritura (B)



Fonte: do autor.

De acordo com os resultados obtidos, os valores máximos de conversão variaram de 80 a 85%. Entretanto, os tempos necessários para alcançar estes valores dependeram do tipo de AGL e biocatalisador. Para os AGL obtidos do óleo

de soja refinado, a conversão máxima foi alcançada em 150 min de reação catalisada por LTL-Octil-SiO₂, enquanto a reação catalisada por LTL-Fenil-SiO₂ alcançou similar conversão apenas em 330 min de reação. Se tratando da conversão dos AGL de óleo de fritura, ambos biocatalisadores atingiram a máxima conversão em 120 min, porém LTL-Octil-SiO₂ foi ligeiramente mais ativo.

Este estudo foi conduzido para avaliar o efeito do processamento térmico do óleo de soja na produção de ésteres lubrificantes. Conforme descrito na literatura, a aplicação de óleo processado (óleo de fritura) é mais atrativa na indústria oleoquímica, pois grande parte deste material é descartado na natureza sem tratamento prévio e gera grandes problemas ambientais (MANSIR *et al.*, 2018).

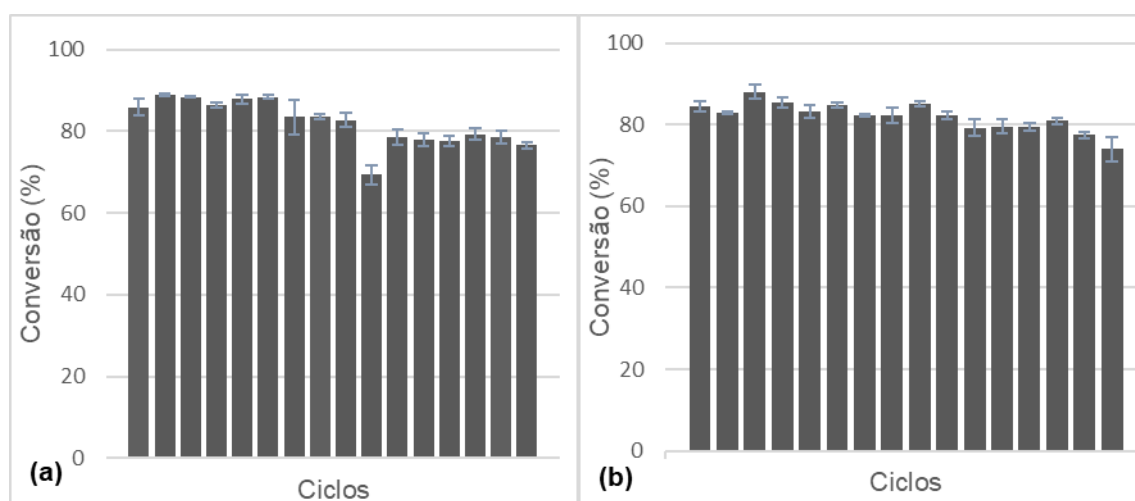
Apesar da quantidade de proteína imobilizada na Fenil-SiO₂ ser ligeiramente maior (Tabela 2), o biocatalisador preparado via imobilização de LTL em Octil-SiO₂ foi mais eficiente nas reações de esterificação (Figura 11). Estes resultados poderiam ser explicados por possível impedimento estérico causado pelos grupos fenil ao sítio ativo da enzima. Os grupos fenil possuem um volume molecular maior que os grupos octil (cadeia linear) e a interação destes grupos com a região do sítio ativo da lipase podem ter reduzido a acessibilidade dos materiais de partida (moléculas de AGL e decanol). Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior realizado em nosso grupo, referente à esterificação de decanol com ácido oleico comercial em meio isento de solvente catalisada por LTL imobilizada em partículas de sílica de casca de arroz funcionalizada com grupos aminopropil (MIGUEZ *et al.*, 2018). Máxima conversão de 87% foi alcançada após 180 min de reação sob similares condições experimentais.

A adoção de substratos naturais como AGL de óleo de soja refinado e de fritura reduziu o tempo de reação requerido para alcançar similar conversão em 30 min e 60 min, mostrando que o biocatalisador preparado neste estudo tem maior atividade para ácidos graxos poli-insaturados existentes na composição dos óleos de soja e de fritura. Além disso, a maior afinidade da enzima por ácidos graxos obtidos de substratos (óleo vegetal e residual) é mais atrativa para a indústria oleoquímica nacional, devido ao menor custo comparado com ácidos graxos puros como ácido oleico.

3.3.3 Testes de estabilidade operacional do biocatalisador

Os testes de reuso após sucessivas bateladas de reação de esterificação foram realizados empregando Octil-SiO₂ devido à sua maior atividade catalítica. Os tempos de reação adotados nestes ensaios foram aqueles determinados acima – 120 min e 150 min de reação para os AGL do óleo de fritura e óleo de soja refinado, respectivamente. Estes resultados estão sumarizados na Figura 15. No primeiro ciclo de reação, os valores de conversão foram da ordem de 85% para ambos os sistemas de reação. Um ligeiro decréscimo da atividade foi verificado após sucessivos ciclos de reação e no 16º ciclo, a conversão para os sistemas conduzidos com AGL do óleo de soja refinado e de fritura foi de 76,6 e 74%, respectivamente.

Figura 15 - Testes de reuso em sistemas de bateladas sequenciais de reação de esterificação de AGL de óleo de soja refinado (a) e de fritura (b) com decanol catalisada por LTL-Octil-SiO₂.



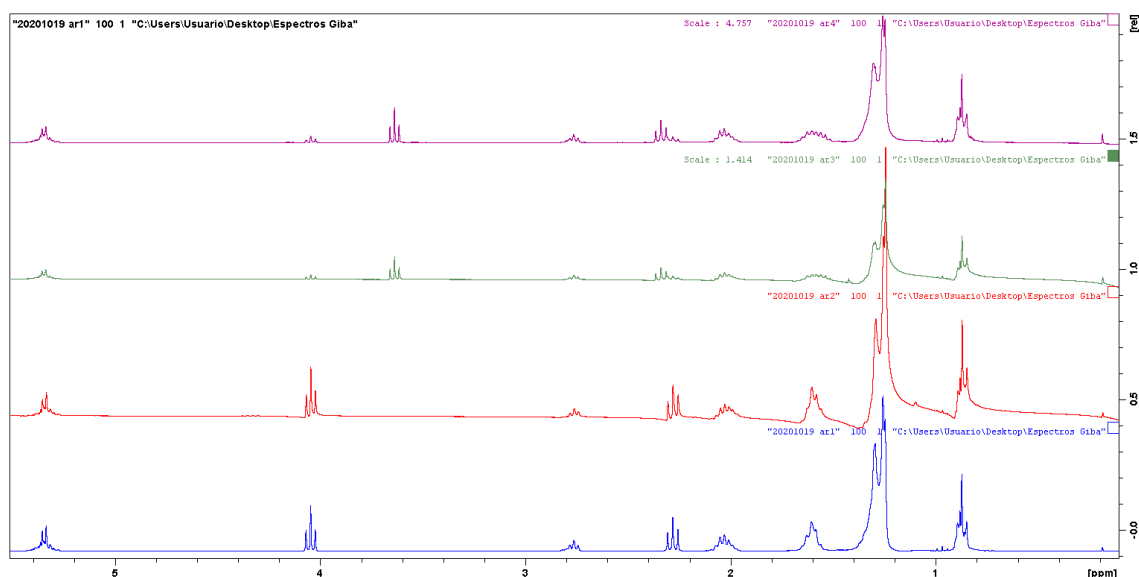
Fonte: do autor.

Como pode ser visto na Figura 15, o biocatalisador reteve 88% de sua atividade inicial após 16 ciclos de reação. Esta satisfatória estabilidade pode ser atribuída à correta remoção de substratos residuais de seu microambiente e moléculas de água produzidas na reação, que poderiam acelerar a dessorção da enzima. Além disso, uma forte interação da enzima com os grupos octil do suporte pode ter também estabilizado a estrutura tridimensional da LTL (GAMA *et al.*, 2019; LAGE *et al.*, 2016).

3.3.4 Caracterização dos biolubrificantes por RMN

Após a síntese enzimática para obtenção dos ésteres AGL de óleo de fritura e AGL de óleo refinado, foram realizadas extrações em fase sólida (EFS) de ambos produtos de reação com a finalidade de separar os ésteres formados dos seus respectivos precursores. Após a aplicação de cada uma das amostras no cartucho de EFS, as amostras foram eluídas com hexano:éter dietílico (97:3), eluente mais apolar, e (50:50), mais polar. As frações coletadas com estes eluentes foram analisadas por RMN-¹H e ¹³C. Os espectros de RMN-¹H das frações obtidas pela eluição utilizando o eluente mais apolar das duas amostras (OSR-azul) e (OSF-vermelho) encontram-se na Figura 16:

Figura 16 - Espectros de RMN das frações de hexano/éter dietílico 97:3 de OSR (azul), 97:3 de OSF (vermelho), 1:1 de OSR (verde) e 1:1 de OSF (rosa).

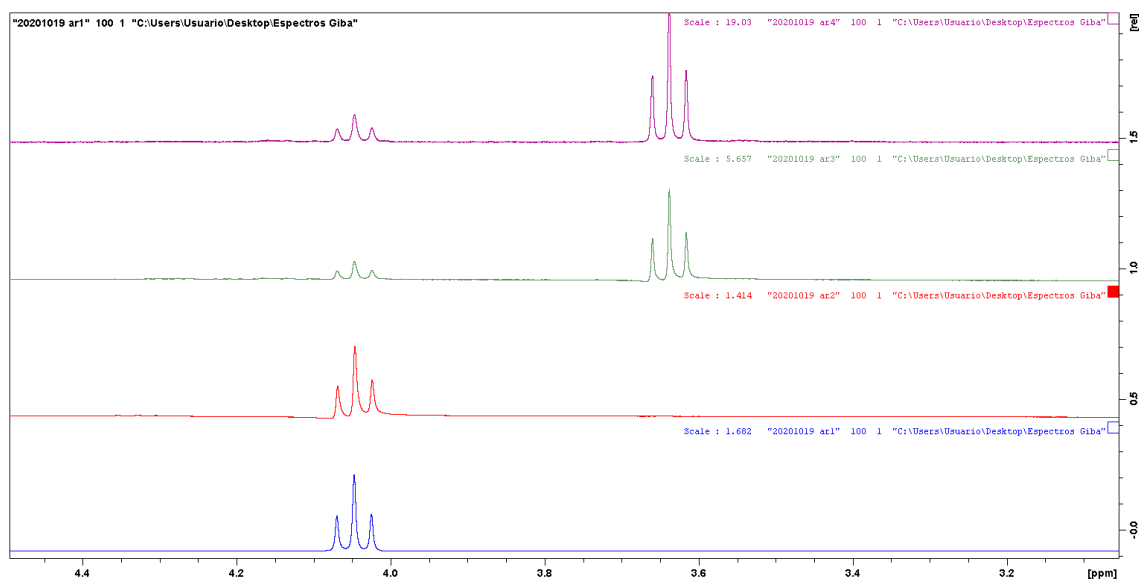


Fonte: do autor

Ao se analisar os espectros de RMN-¹H de OSR e OSF, ambas eluídas com os eluentes citados na proporção (97:3), é possível observar um tripleto em 4,05 ppm característico de hidrogênios ligados a carbono vizinho a oxigênio de grupo carboxila de éster (-COOCH₂-), bem como o sinal em 2,25 ppm, um outro tripleto, característico de hidrogênios ligados a carbono vizinho ao grupo carboxila, indicando, portanto, a formação do éster. As expansões dos espectros presentes nas Figuras 17 e 18 permitem a visualização dos tripletos em 4,05 e 2,25 ppm,

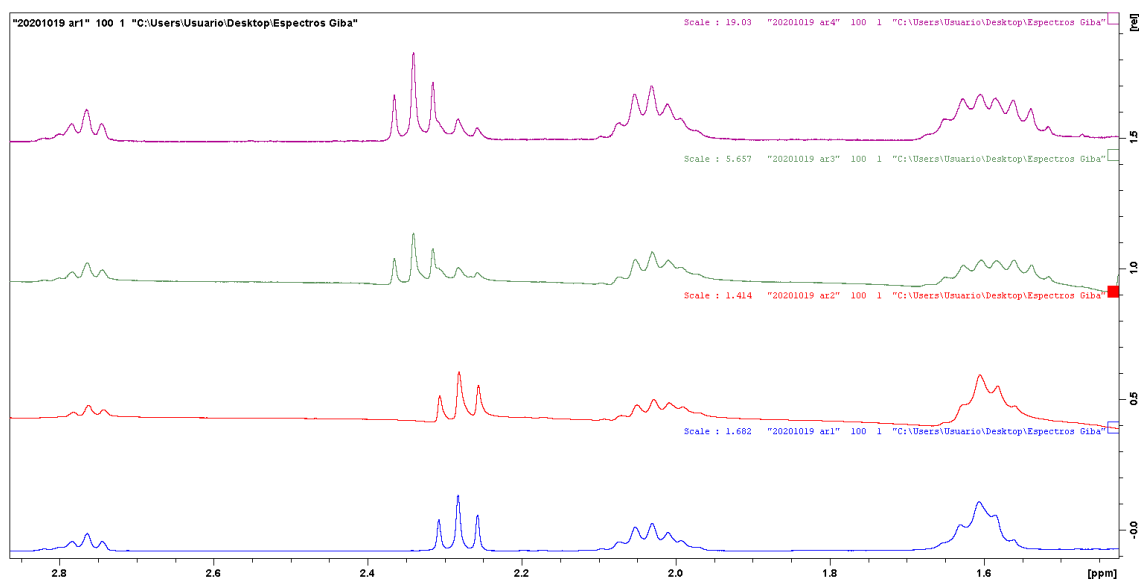
respectivamente. Além disso, no espectro de RMN- ^{13}C da fração ORS (presente na Figura 19), nota-se a presença de um carbono em 64 ppm característico de carbono sp^3 ligado a oxigênio, mais um indicativo da formação do éster. Também foi possível observar sinais de hidrogênio em 5,35 ppm e de carbonos em 130,0 ppm de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . Estes dados indicam que o ácido carboxílico de origem apresentava duplas ligação, uma vez que o álcool utilizado na síntese foi o 1-decanol.

Figura 17 - Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de 3,2 ppm a 4,4 ppm.



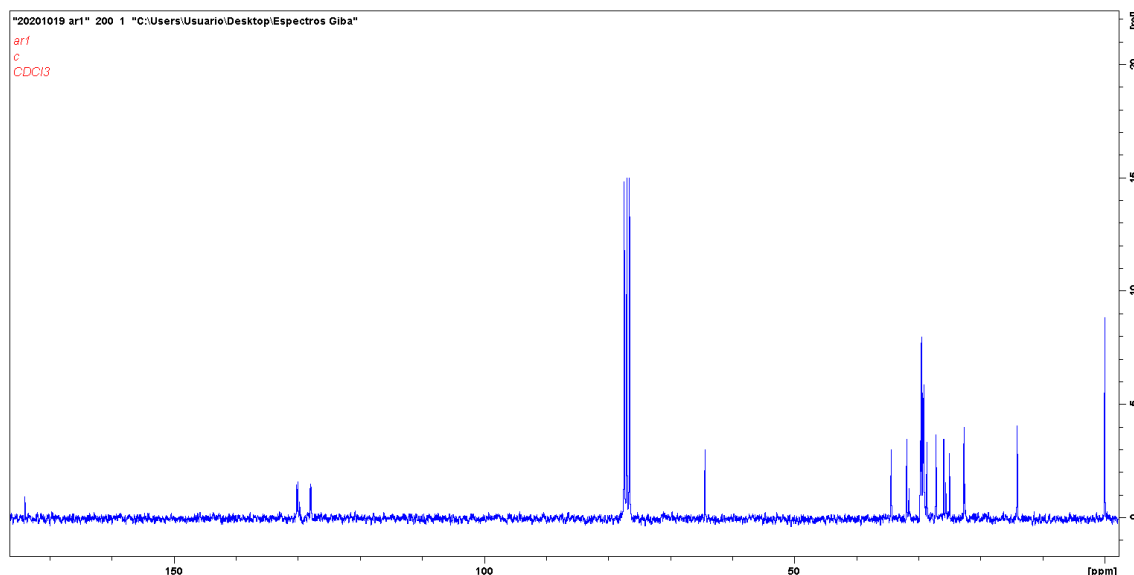
Fonte: do autor.

Figura 18 - Expansão do espectro de RMN na região de 1,4 ppm a 2,8 ppm.



Fonte: do autor.

Figura 19 - Espectro de RMN 13C do éster de OSR



Fonte: do autor.

Já nas frações eluídas com o eluente na proporção (50:50, v:v), notam-se sinais de hidrogênios do éster formado, porém, em intensidade menor (4,05 ppm) (Figura 14), mas também sinais que provavelmente seja do álcool 1-decanol em 3,62 ppm (triplete) com intensidade maior e característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico (HC-OH), sendo, portanto, estas frações compostas por misturas do álcool com um pouco do éster, que possivelmente, havia ficado retido no cartucho.

Embora esta análise tenha confirmado a formação dos ésteres e algumas características de suas estruturas moleculares, não foi possível distingui-los. Como há uma mistura de ésteres devido a presença de diferentes ácidos graxos nos óleos vegetais, os deslocamentos dos átomos de hidrogênio e carbono coincidem, impedindo a determinação da estrutura molecular dos ésteres produzidos.

3.3.5 Análise de viscosidade dos biolubrificantes

A viscosidade é um parâmetro muito importante no desenvolvimento de novos lubrificantes. Os valores de viscosidade cinemática a 40°C e a 100°C são utilizados para a determinação do índice de viscosidade, que indica o comportamento da viscosidade em baixas e altas temperaturas. Um alto índice de viscosidade indica que não há mudanças significativas na viscosidade em uma determinada variação

de temperatura. Quanto maior o índice de viscosidade, melhor a capacidade lubrificante (ATTIA *et al.*, 2020).

Os parâmetros físicos dos ésteres produzidos são mostrados na Tabela 3. A complexidade da cadeia dos triacilgliceróis é responsável pela alta viscosidade dos óleos vegetais (ENCINAR *et al.*, 2020). A esterificação dos AGL com decanol levou a formação de monoésteres que possuem uma estrutura molecular menos complexa que a dos triacilgliceróis que, conseqüentemente, ocasiona uma redução na viscosidade (CERÓN *et al.*, 2018).

As análises de viscosidade foram realizadas nos produtos reacionais não-purificados, a fim de avaliar suas capacidades lubrificantes. Mesmo sem purificação, os ésteres produzidos a partir de AGL de óleo de soja e de fritura apresentaram uma boa capacidade lubrificante, indicada pelos índices de viscosidade próximos de 200 (Tabela 3) (CAVALCANTI *et al.*, 2018; CERÓN *et al.*, 2018). Estes valores estão de acordo com os índices de viscosidade de diversos biolubrificantes produzidos a partir do óleo de soja.

Como pode ser visto na Tabela 3, o índice de viscosidade varia de acordo com a fonte de AGL e com o álcool utilizado na esterificação (ATTIA *et al.*, 2020; BEZERRA *et al.*, 2020; ENCINAR *et al.*, 2020; ZAINAL *et al.*, 2018). Grande parte da estrutura molecular dos AGL é mantida após as reações de esterificação e, portanto, sua composição pode influenciar nas características do biolubrificante produzido (ENCINAR *et al.*, 2020). A presença de cadeias ramificadas e insaturações, bem como o tipo do álcool utilizado (monoálcool, diálcool e triálcool) podem influenciar no índice de viscosidade do éster obtido (ATTIA *et al.*, 2020; ENCINAR *et al.*, 2020). Nos estudos onde a produção de biolubrificantes foi realizada pela formação de di e triésteres, os valores de viscosidade cinemática foram maiores devido a uma maior massa molecular presente nesse tipo de formulação (ENCINAR *et al.*, 2020). Os resultados do presente estudo sugerem uma boa capacidade lubrificante dos ésteres obtidos a partir de óleo de soja refinado e óleo de fritura, devido a semelhança aos parâmetros físicos dos ésteres biolubrificantes presentes na literatura.

Tabela 3 - Parâmetros físicos de ésteres com propriedades lubrificantes descritos na literatura.

Parâmetros físicos	Unidade	Óleo de soja + decanol ^a	Óleo de fritura + decanol ^a	Óleo de girassol + EG ^b	Óleo de fritura + EG ^b	Óleo de babaçu + TMP ^c	Óleo de soja + TMP ^d	Óleo de soja + NPG ^d	Óleo de fritura + TMP ^e	Colza + 2-EH ^f	Girassol + 2-EH ^f	Óleo de fritura + 2-EH ^f
Massa específica	Kg/m ³	865	867	763	843	920	917,8	904,8	895	849	852	861
Viscosidade cinemática (40°C)	mm ² /s	8,7	8,9	12	25	13,3	38,64	21,22	15,5	7,97	7,47	7,40
Viscosidade cinemática (100°C)	mm ² /s	2,8	2,9	4	5	3,2	8,324	4,930	4,24	*	*	*
Índice de viscosidade	adimensional	190	204	196	147	104	199	167	196	240	228	218

Fonte: do autor.

Legenda: ^a Presente estudo; ^b Attia *et al.*, 2020; ^c Bezerra *et al.*, 2020; ^d Fernandes *et al.*, 2020; ^e Soufi *et al.*, 2019; ^f Encinar *et al.*, 2020.

EG: Etilenoglicol; TMP: Trimetilopropano; NPG: Neopentilglicol; 2-EH: 2-etil-hexanol; *não especificado.

3.4 CONCLUSÃO

Neste estudo, um novo suporte foi preparado por funcionalização de partículas de sílica de casca de arroz com grupos fenil (Fenil-SiO₂) para a imobilização de LTL por ativação interfacial. O biocatalisador foi empregado na produção de oleato de cetila e máxima conversão de 92% após 330 min de reação foi observado. Além disso, ele foi altamente estável após 7 bateladas de reação. Devido à sua satisfatória atividade e estabilidade em reações de esterificação, ele foi também empregado em reações de esterificação de AGL obtidos do óleo de soja refinado e de fritura com decanol visando a produção de biolubrificantes. De acordo com os resultados obtidos, biocatalisador LTL-Octil-SiO₂, um biocatalisador preparado em nosso grupo de pesquisa aplicado na produção de biossurfactantes e ésteres cosméticos, mostrou-se o mais eficiente na produção de biolubrificantes – conversão máxima de 85% dos AGL de óleo de fritura e de óleo de soja refinado após 120 e 150 min de reação, respectivamente. Além disso, os testes de estabilidade operacional mostraram que o biocatalisador reteve 88% da atividade inicial após 16 ciclos consecutivos de reação. Estes resultados mostram que a aplicação de AGL oriundos do óleo de fritura, uma matéria-prima de baixo custo e de fácil obtenção que gera grandes problemas ao meio ambiente, é mais interessante na produção de ésteres (biolubrificantes), pois sua aplicação não compete com o óleo de soja não processado que possui aplicação na indústria de alimentos. Embora, LTL imobilizada em Fenil-SiO₂ não tenha sido o mais ativo na produção de ésteres decílicos, este suporte será empregado na imobilização de outras lipases microbianas para a produção de ésteres cosméticos.

3.5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Produção de biolubrificantes em modo contínuo (reatores de leito fixo e fluidizado);
- b) Aplicação dos suportes na imobilização de lipases comerciais de baixo custo como Eversa Transform 2.0;
- c) Aplicação de outros óleos como matéria-prima, como óleo de palma, macaúba ou óleo microbiano;
- d) Análise econômica do processo de produção de biolubrificantes a partir dos óleos de fritura e soja.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, [Netherlands], v. 311, p. 1-12, 2017.
- ALVES, M. D.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [Netherlands], v. 133, n. 1, p. S377-S387, 2016.
- ANDERSEN, T. **Isolation and characterization of wax esters from *Calanus finmarchicus***. Tese (Mestrado em Farmácia) - Natural Products and Medicinal Chemistry Research Group, Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø. Tromsø, p. 70, 2010.
- ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS. **Petroleum Products Lubricants and Fossil Fuels**, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 2005.
- ATTIA, N. K.; EL-MEKKAWI, S. A.; ELARDY, O. A.; ABDELKADER, E. A. Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. **Fuel**, [Netherlands], v. 271, p.117578, 2020.
- BEZERRA, R. C. F.; RODRIGUES, F. E. A.; ARRUDAB, T. B. M. G.; MOREIRA, F. B. F.; CHAVES, P. O. B.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; RICARDO, N. M. P. S. Babassu-oil-based biolubricant: Chemical characterization and physicochemical behavior as additive to naphthenic lubricant NH-10. **Industrial Crops & Products**, [Netherlands], v. 154, p. 112624, 2020.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [United States], v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAVALCANTI, E. D. C.; AGUIEIRAS, E. C. G.; SILVA, P. R.; DUARTE, J. G.; CIPOLATTI, E. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SILVA, J. A. C.; FREIRE, D. M. G. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, [Netherlands], v. 215, p. 705-713, 2018.
- CECILIA, J. A.; PLATA, D. B.; SABOYA, R. M. A.; LUNA, F. M. T.; CAVALCANTE JR, C. L.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E. An overview of the biolubricant production process: Challenges and future perspectives. **Processes**, [Switzerland], v. 8, p. 257, 2020.
- CERÓN, A. A.; VILAS BOAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, [United Kingdom], v. 119, p. 166-172, 2018

ENCINAR, J. M.; NOGALES, S.; GONZÁLEZ, J. F. Biodiesel and biolubricant production from different vegetable oils through transesterification. **Engineering Reports**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 10, 2020.

FERNANDES, K. V.; CAVALCANTI, E. D. C.; CIPOLATTI, E. P.; AGUIEIRAS, E. C. G.; PINTO, M. C. C.; TAVARES, F. A.; SILVA, P. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. ARANA-PEÑAC, S.; PINTO, J. C.; ASSUNÇÃO, C. L. B.; SILVA, J. A. C.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysts Today**, [Netherlands], v. 362, p. 122-129, 2020.

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

GAMA, R. S.; BOLINA, I. C. A.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. A novel functionalized SiO₂-based support prepared from biomass waste for lipase adsorption. **Materials Chemistry and Physics**, [Netherlands], v. 234, p. 146-150, 2019.

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

MANSIR, N.; TEO, S. H.; RASHID, U.; SAIMAN, M. I.; TAN, Y. P.; ALSULTAN, G. A.; TAUFIQ-YAP, Y. H. Modified waste egg shell derived bifunctional catalyst for biodiesel production from high FFA waste cooking oil. A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [Netherlands], v. 82, n. 3, p. 3645-3655, 2018.

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

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

SOUFI, M. D.; GHOBADIAN, B.; MOUSAVI, S. M.; NAJAFI, G.; AUBIN, J. Valorization of waste cooking oil based biodiesel for biolubricant production in a vertical pulsed column: Energy efficient process approach. **Energy**, [United Kingdom], v. 189, p. 116266, 2019.

SYAHIR, A. Z; ZULKIFLI, N. W. M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; ALABDULKAREM, A.; GULZAR, M.; KHUONG, L. S.; HARITH, M. H. A review on

bio-based lubricants and their applications. **Journal of Cleaner Production**, [Netherlands], v. 168, p. 997-1016, 2017.

VESCOVI, V.; KOPP, W.; GUIŚÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multiattached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional aminoglutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, [United Kingdom], v. 51, n. 12, p. 2055-2066, 2016.

ZAINAL, N. A.; ZULKIFLI, N. W. M.; GULZAR, M.; MASJUKI, H. H. A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [Netherlands], v. 82, p. 80-102, 2018.

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