

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**FERNANDA APARECIDA PASSARI**

**PRODUÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICO POR ESTERIFICAÇÃO  
CATALISADA POR LIPASE IMOBILIZADA VIA ADSORÇÃO FÍSICA EM  
SUPORTE HIDROFÓBICO**

**Alfenas/MG**

**2022**

FERNANDA APARECIDA PASSARI

PRODUÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICO POR ESTERIFICAÇÃO  
CATALISADA POR LIPASE IMOBILIZADA VIA ADSORÇÃO FÍSICA EM  
SUPORTE HIDROFÓBICO

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes  
Coorientador: Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Passari, Fernanda Aparecida.

Produção de um antioxidante lipofílico por esterificação catalisada por lipase imobilizada via adsorção física em suporte hidrofóbico / Fernanda Aparecida Passari. - Alfenas, MG, 2022.

60 f. : il. -

Orientador(a): Adriano Aguiar Mendes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Galato de isoamila. 2. Lipase. 3. Imobilização. 4. Otimização. 5. Reuso.  
I. Mendes, Adriano Aguiar, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

**PRODUÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE LIPOFÍLICO POR ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE IMOBILIZADA VIA ADSORÇÃO FÍSICA EM SUPORTE HIDROFÓBICO**

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

Aprovada em: 08 de março de 2022

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Larissa de Freitas  
Instituição: Universidade de São Paulo (EEL/USP)

Profa. Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por Adriano Aguiar Mendes, Presidente, em 08/03/2022, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por LARISSA DE FREITAS, Usuário Externo, em 08/03/2022, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por ANA KARINE FURTADO DE CARVALHO, Usuário Externo, em 08/03/2022, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0687756 e o código CRC 53ADA879.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço o apoio das agências de fomento para o desenvolvimento deste trabalho, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-01691-21) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processos 404929/2016-8 e 310633/2020-6) pelo suporte financeiro.

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

## RESUMO

O objetivo do projeto consistiu na produção enzimática de um éster com propriedades antioxidantes e antimicrobianas a partir da esterificação de álcool isoamílico, um produto obtido do óleo fúsel e ácido gálico (ácido 3,4,5-tridróxibenzoico) em meio de terc-butanol. Testes preliminares realizados em nosso grupo de pesquisa empregando diferentes preparações de extratos brutos comerciais de lipases nas formas livres (solúveis e em pó) obteve a máxima atividade catalítica com a lipase *Pseudomonas fluorescens* (LPF), comercialmente conhecida como Lipase Amano AK. Na realização deste projeto foi empregada a enzima na sua forma imobilizada por adsorção física (mecanismo de ativação interfacial) em partículas de poli(estireno-divinilbenzeno). Este suporte foi selecionado devido à sua capacidade de adsorção de lipases, um importante requisito para a preparação de biocatalisadores com alta atividade catalítica. A preparação do biocatalisador heterogêneo foi realizada em tampão acetato de sódio pH 5,0 (5 mM) por 18 h empregando um carregamento inicial de proteína de 40 mg/g de suporte, onde foi obtido a máxima concentração de proteína imobilizada de aproximadamente 33 mg g<sup>-1</sup>. A sua atividade catalítica na hidrólise da emulsão do azeite de oliva em pH 8,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM) e 37°C foi de 121,4 ± 5,5 U/g de biocatalisador. Após a preparação do biocatalisador foi avaliado o efeito de relevantes parâmetros na produção do éster como: concentração de biocatalisador (5% a 25% m/v), temperatura de reação (20°C a 70°C) e razão molar ácido:álcool (1: 0,4 a 1:4) empregando um delineamento composto central rotacional (DCCR). As reações foram conduzidas em meio de terc-butanol em condições experimentais fixadas (30 minutos de reação, agitação mecânica de 200 rpm e concentração de ácido gálico de 250 mM). Como variável de resposta determinou-se a porcentagem de conversão do ácido por método titulométrico. Nas condições ótimas a máxima conversão de 55% após 90 min de reação foi obtida para a lipase imobilizada, nestas mesmas condições, a máxima conversão alcançada foi de 37% observado para a lipase na forma livre. O biocatalisador preparado obteve na ordem de 40% de sua atividade inicial após 5 bateladas consecutivas de reação. Este estudo mostra que um protocolo apropriado de imobilização da enzima pode melhorar o seu desempenho catalítico e reuso após sucessivas reações de produção de um éster interesse industrial como em meios orgânicos.

**Palavras-chave:** Galato de isoamila; Lipase; Imobilização; Otimização, Reuso.

## ABSTRACT

The objective of this project consisted of the enzymatic production of isoamyl gallate, an ester with antioxidant and antimicrobial properties, via direct esterification reaction of isoamyl alcohol, a renewable alcohol from fusel oil, with gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) performed in tert-butanol system. Preliminary tests performed in our lab using several crude lipase extracts (soluble or powder extracts) as biocatalysts showed that lipase from *Pseudomonas fluorescens* (PFL), commercially known as Lipase Amano AK, gave the highest catalytic activity, thus selected to perform the present project. This lipase was used in its immobilized form via physical adsorption by mechanism of interfacial activation on poly(styrene-divinylbenzene) particles. This support has been chosen due to its high capacity to adsorb high lipase amount, an important requisite for preparing active biocatalysts. The heterogeneous biocatalyst (immobilized lipase) was prepared in buffer sodium acetate solution pH 5.0 (5 mM) by 18h of contact time using an initial protein loading of 40 mg per gram of support. High enzyme loaded biocatalyst (immobilized protein concentration around of 33 mg/g of support) was obtained using an initial protein loading of 40 mg g<sup>-1</sup>. Its hydrolytic activity was of 121.4 ± 5.5 U/g, which was determined on the hydrolysis of olive oil emulsion at pH 8.0 (buffer sodium phosphate using an ionic strength of 100 mM) and 37°C. Subsequently, the effect of relevant factors such as biocatalyst concentration (5% - 25% m/v), reaction temperature (25°C a 70°C), and acid:alcohol molar ratio on the esterification reactions was evaluated using a central composite rotatable design (CCRD). This set of experiments was performed under fixed conditions: 30 minutes of reaction time, mechanical stirring of 200 rpm, and acid concentration of 250 mM. Acid conversion percentage will be taken as response (dependent variable). Maximum acid conversion of only 37% was observed using crude lipase extract under such experimental conditions. The prepared biocatalyst (immobilized PFL) retained 40% of its original activity after five consecutive esterification batches of 90 minutes each. These results show that a proper 90 minutes immobilization protocol may improve its catalytic performance and reusability after successive batches of ester production via esterification in a solvent system.

**Keywords:** Isoamyl gallate; Lipase; Immobilization; Optimization; Reusability.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Representação da estrutura molecular do ácido gálico.....**16**
- Figura 2 - Técnicas de imobilização de enzimas.....**23**
- Figura 3- Mecanismo de ativação interfacial de lipase em suportes hidrofóbicos..... **26**

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Esquema representativo de produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio orgânico .....**42**
- Figura 2 - Efeito do tempo de reação a produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio orgânico catalisada por LPF na forma livre e imobilizada.....**47**
- Figura 3 - Testes de reuso do biocatalisador preparado (lipase imobilizada) após sucessivas bateladas de reação .....**48**



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudo comparativo das propriedades de LPF nas formas livre e imobilizada.....	44
Tabela 2 - Planejamento de experimentos para a produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio de terc-butanol.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCCR	Delineamento composto central rotacional
LPF	Lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PEDB	Poli(estireno-divinilbenzeno)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
	<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1	Compostos fenólicos – Ácido gálico .....	15
2.2	Enzimas.....	17
2.3	Enzimas em meios não convencionais.....	18
2.4	Imobilização de enzimas.....	21
2.5	Imobilização de lipase por adsorção .....	24
	Referências bibliográficas .....	28
	<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO: Produção de éster de ácido gálico catalisada por lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em suporte hidrofóbico.....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os ésteres são uma das mais importantes classes de compostos orgânicos que são sintetizados por vários mecanismos como transesterificação, interesterificação e esterificação (GUNSTONE, 1999; NARWAL *et al.*, 2013; SOUMANOU *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2021; STERGIOU *et al.*, 2013). A esterificação é um dos métodos mais empregados e consiste na reação direta de um álcool e um ácido carboxílico com a eliminação de água (SOUSA *et al.*, 2021; STERGIOU *et al.*, 2013). Ésteres de ácido gálico são compostos que exibem várias atividades biológicas, incluindo proteção cardiovascular, atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticâncer, anti-inflamatórias e antioxidante (GUTIERREZ *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020). O ácido gálico é um antioxidante natural, porém sua alta polaridade dificulta sua solubilização em meio lipídico, dessa forma as modificações na molécula de ácido gálico como a esterificação, podem melhorar sua lipofilicidade contribuindo para o aumento da dispersão em óleos e gorduras (GUTIERREZ *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2020). Essas alterações podem ser produzidas via catálise ácida ou enzimática (GUTIERREZ *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2021; PUTON, 2019).

A tecnologia convencional para a produção de ésteres de interesse industrial, incluindo ésteres de ácido gálico, consiste principalmente na esterificação de ácidos graxos e álcoois de cadeias longas em temperaturas elevadas, acima de 70°C, e longos tempos de reação (entre 5h e 15h) empregando catalisadores homogêneos ácidos (NGUYEN *et al.*, 2021). Além disso, a aplicação de ácidos inorgânicos como HCl, HClO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dentre outros, podem causar danos aos equipamentos por serem altamente corrosivos (AKERMAN *et al.*, 2011; RAVI *et al.*, 2020). Por outro lado, a síntese de ésteres catalisada por enzimas, especificamente lipases, algumas das desvantagens acima referidas podem ser eliminadas, portanto, processos enzimáticos são uma promissora alternativa à rota química. Estes biocatalisadores são altamente seletivos e operam em condições amenas de temperatura e pressão, o que reduz a formação de subprodutos e conseqüentemente o volume de efluentes gerados nas etapas de recuperação e purificação do produto (BASSO; SERBAN, 2019). Lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são importantes enzimas de uso industrial, elas possuem a função biológica de hidrolisar moléculas de

triacilgliceróis (óleos e gorduras), seus substratos naturais, resultam na liberação de ácidos graxos livres, glicerol, monoglicerol e diacilglicerol. Estas enzimas também catalisam reações como esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídeos em meio orgânico (ADLERCREUTZ, 2013; BOLINA *et al.*, 2021). Este fenômeno é devido à sua capacidade de utilização em uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade frente à temperatura e solventes orgânicos e à sua elevada seletividade (ADLERCREUTZ, 2013; BOLINA *et al.*, 2021; FERNANDEZ, 2010; RIOS *et al.*, 2018). Devido à sua alta versatilidade para diferentes reações químicas, elas são amplamente usadas em hidrólise de diferentes triacilgliceróis bem como na síntese de ésteres de grande interesse industrial como biodiesel, lipídeos estruturados, aromas, emulsificantes, biolubrificantes, pré-tratamento de madeira, efluentes ricos em gorduras dentre outras aplicações como na síntese de antioxidante (ésteres de ácido gálico) (ADLERCREUTZ, 2013; BASSO; SERBAN, 2019; BOLINA *et al.*, 2021; GUTIERREZ *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2021)

A aplicação destas enzimas na forma livre em reações de biotransformação em meios orgânicos como a esterificação não é apropriada em decorrência da formação de agregados de lipases por adsorção de moléculas polares produzidas no meio reacional como água e glicerol. Além disso, a difícil recuperação do biocatalisador e a baixa atividade catalítica por influência de solventes que algumas vezes inativam a enzima, também inviabilizam a sua aplicação nestes sistemas reacionais (BILAL; IQBAL, 2019; ZHONG *et al.*, 2020). A imobilização de enzimas, incluindo lipases, em diferentes materiais suportes é uma importante ferramenta para a estabilização de suas estruturas tridimensionais ativas, permite a sua reutilização, reduz a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos e facilita a separação e purificação do produto de interesse ao final do processo, pois a enzima se encontra insolúvel no meio (ADLERCREUTZ, 2013; BILAL; IQBAL, 2019; BOLINA *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2019; ZHONG *et al.*, 2020).

Diferentes protocolos de imobilização de lipases têm sido propostos (BOLINA *et al.*, 2021). Entretanto, o mais empregado na imobilização de lipases é a adsorção física em suportes hidrofóbicos – conhecido como mecanismo de ativação interfacial (ADLERCREUTZ, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2019). As lipases possuem uma cadeia polipeptídica chamada de “*lid*” ou tampa hidrofóbica que cobre seu sítio ativo e em meio aquoso, o seu sítio ativo é inacessível ao substrato (conformação fechada).

Na presença de uma superfície hidrofóbica, como os suportes hidrofóbicos, o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta. Neste caso, a lipase é fortemente adsorvida à matriz hidrofóbica e reconhece esta matriz similarmente aos seus substratos naturais (gota de óleo) immobilizando a enzima sob a conformação aberta (FERNANDEZ, 2010; BOLINA *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2019)

O objetivo deste estudo foi a produção enzimática de um éster lipofílico de ácido gálico em meio de terc-butanol. Neste projeto foi selecionado o álcool isoamílico para a produção do éster, a seleção deste álcool foi baseada por se tratar de uma matéria-prima renovável, principal constituinte do óleo fúsel – 65% m/m (CERÓN *et al.*, 2018) e de fácil aquisição em nosso país. O óleo fúsel é a fração menos volátil obtida no processamento do álcool combustível, um subproduto produzido na fermentação alcoólica (CERÓN *et al.*, 2018). Para a realização destes testes foi selecionada a lipase microbiana *Pseudomonas fluorescens* como catalisador devido à sua alta atividade catalítica nesta reação e na sua forma livre. As reações de esterificação foram conduzidas na presença de solvente orgânico polar, terc-butanol, devido à alta solubilidade do ácido gálico nas condições experimentais propostas para a realização deste estudo. Além disso, o uso de terc-butanol como solvente na produção de ésteres de interesse industrial tem sido amplamente reportado na literatura especializada (HE *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2018). A seleção do suporte utilizado, o poli(estireno-divinilbenzeno), deve-se à sua elevada área específica ( $500\text{m}^2/\text{g}$ ) e diâmetros de poro ( $250\text{ \AA}$ ) que permite imobilizar alta concentração de proteína, um importante requisito na preparação de biocatalisadores com alta atividade catalítica em meio orgânico (ALVES *et al.*, 2017; LAGE *et al.*, 2016). O presente projeto trata-se de uma nova proposta de grande interesse para o setor industrial nacional, visto que os materiais de partida aplicados na realização deste projeto são obtidos de fontes renováveis e a aplicação de enzimas imobilizadas como alternativa aos catalisadores químicos convencionais, como ácidos inorgânicos descritos acima, são de suma importância para estabelecer processos de interesse industrial tecnologicamente mais limpos.

## CAPÍTULO 1

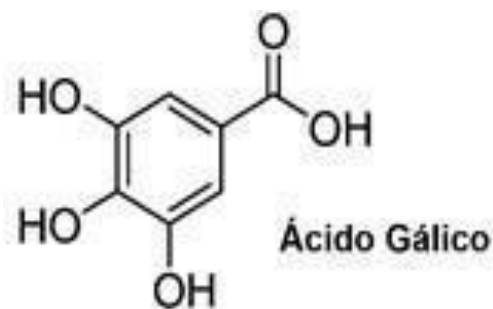
### 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS - ÁCIDO GÁLICO

Os compostos fenólicos estão entre os mais abundantes e importantes grupos de metabólitos secundários de plantas, com finalidade associada à inibição ou ativação de uma diversidade de sistemas enzimáticos (SCHAFRANSKI, 2019). Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos nas plantas e são um grupo muito diversificado, incluindo os flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, entre outros. Estes metabólitos secundários exercem diferentes funções nas plantas em que são biossintetizados, como a proteção contra patógenos e a contribuição para a pigmentação (KESSLER, *et al.*, 2018). Atribui-se às oxidações dos ácidos graxos poli-insaturados (como o ácido linoleico, presente em quantidades relativamente altas no óleo de soja) uma forte influência no estímulo ao desenvolvimento de doenças de grande importância na atualidade, como as enfermidades coronárias (artérias coronárias) e determinados tipos de câncer (AMARAL, *et al.*, 2018).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) é um composto natural fenólico encontrado em plantas lignificadas, folhas de chá, frutas como a uva, morango, lúpulo (planta utilizada na fabricação de cervejas), casca de carvalho, hamamélis e outras plantas, podendo ser encontrado livre ou como parte de taninos (GOMES, 2015; PUBCHEM, 2021). Caracteriza-se como um sólido branco cristalino cuja fórmula molecular é  $C_7H_6O_5$  e sua massa molar é de 170,12 g/mol, possui densidade de 1,69 kg/L (20°C), seu pKa é de 4,40 e o ponto de fusão é de 210°C com decomposição entre 235°C a 240°C, produzindo dióxido de carbono e monóxido de carbono, é solúvel em álcool etílico, água, glicerina e praticamente insolúvel em clorofórmio, benzeno e éter de petróleo (PUBCHEM, 2021), sua estrutura molecular está apresentada na figura 1.

**Figura 1-** Representação da estrutura molecular do ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>).



Fonte: O autor, 2022.

Além da atividade antioxidante do ácido gálico, vários estudos têm relatado propriedades anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiulcerogênica, antifúngica entre outras (FERNANDES, *et al.*, 2015). A reação de esterificação consiste basicamente na condensação do ácido carboxílico livre (acil doador) e o álcool (acil receptor), o que resulta na formação de éster e água. A reação de esterificação pode ocorrer em sistemas com um baixo teor de água, com a utilização de solventes ou até mesmo em meios com ausência de solvente. O emprego do solvente é considerado interessante pois aumenta a solubilidade de substratos e produtos, deslocando o equilíbrio termodinâmico da reação para favorecer a esterificação, desfavorecendo assim, a hidrólise (AKACHA; GARGOURI, 2015).

Derivados n-alquil-ésteres do ácido gálico (galatos) têm ampla aplicação como antioxidante na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. O ácido gálico é um importante antioxidante natural, porém sua alta polaridade dificulta sua solubilização em meio lipídico, dessa forma as modificações na molécula de ácido gálico, como a esterificação, podem melhorar sua lipofilicidade, contribuindo para o aumento da dispersão em óleos e gorduras (triacilgliceróis) (GUTIERREZ *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2020), essas alterações podem ser produzidas via catálise ácida ou enzimática. A catálise enzimática mostra-se um processo bastante promissor, devido às condições mais brandas de operação. Os principais ésteres derivados de ácido gálico reportados pela literatura são o galato de metila (–CH<sub>3</sub>), galato de propila (–CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), galato de hexila (–CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>), galato de octila (–CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>) e galato de dodecila (–CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>) (GUTIERREZ *et al.*, 2020; WOLF, 2017; ZHAO *et al.*, 2020).



## 2.2. ENZIMAS

Enzimas são biocatalisadores de natureza proteica que reduzem a energia de ativação de uma reação química sem alterar o seu equilíbrio e conseqüentemente provocam o aumento da velocidade reacional (HOMAEI *et al.*, 2013). As enzimas são moléculas orgânicas produzidas por células vivas e atuam em quase todas as reações metabólicas dos organismos vivos, atuando na hidrólise de compostos complexos e em compostos mais simples (COX; NELSON, 2014).

Elas são classificadas de acordo com suas funções em nível molecular. O papel crucial das enzimas na síntese de API (insumos farmacêuticos ativos) e nas formulações de medicamentos para o tratamento de doenças como câncer e AIDS alimenta a demanda por produtos baseados em enzimas, que por sua vez impulsionam o crescimento desse mercado (ALLIED MARKET RESEARCH, 2018).

A ampla gama de variedades enzimáticas proporciona uma extensa lista de aplicações em diversas áreas da indústria, que são beneficiadas pela utilização de enzimas, sejam elas da forma livre ou imobilizada, tais como: a indústria de alimentos (HE; SIMPSON; ZHANG, 2018), farmacêutica (NAGHDI *et al.*, 2018), cosmética (KHAN; RATHOD, 2015), têxtil (CHAKRABORTY; MADHU, 2017), biolubrificantes (CAVALCANTI *et al.*, 2018), entre outras. O uso de enzimas em biocatálise é bem consolidado com relação ao estabelecimento de processos mais sustentáveis com finalidade biotecnológica (FERNANDEZ, 2019; GIRELLI, *et al.*, 2020). Dentre as enzimas de interesse industrial, as lipases são as mais utilizadas devido a afinidade por diferentes substratos, a ausência de cofatores 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 entre outros (BAEK; ISMAIL, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2019).

As lipases do gênero *Pseudomonas* são enzimas extracelulares que desempenham importante papel no processo biotecnológico devido à suas aplicações (RIOS, *et al.*, 2018) e a grande disponibilidade comercial associados as mesmas (BERNAL, *et al.*, 2017). A versatilidade dessas enzimas é considerada uma característica promíscua, diferenciando das demais, pois possibilita uma

versatilidade em diversas condições operacionais, reações fora da sua naturalidade como condições drásticas de pH e temperatura e catálise de uma grande variedade de substratos (CARVALHO *et al.*, 2014).

*Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria que tem sido considerada um biocatalisador eficiente para diversos processos biotecnológicos, como agregação de valor em produtos por meio de reações de esterificação e hidrólise, bem como por possuir alto rendimento e ser enantiosseletiva (RIOS *et al.*, 2018). São amplamente utilizadas em detergentes, alimentos, têxteis, produtos farmacêuticos e indústrias. A imobilização de lipases é uma ferramenta poderosa para a aplicação dessas enzimas em processos industriais. O objetivo principal da imobilização é a recuperação do biocatalisador por etapas de separação simples, como a filtração (RODRIGUES, *et al.*, 2011; YAN, *et al.*, 2013).

Há diversos relatos sobre estudos de imobilização de lipases de *Pseudomonas*, devido à sua gama de aplicações industriais (MANOEL, *et al.*, 2015; MENDES, *et al.*, 2011) como a aplicação na síntese de ésteres utilizados na indústria alimentícia, síntese de biocombustíveis, síntese de drogas quirais puras enantioméricas utilizadas em indústria farmacêutica, entre outros (ANGAJALA, *et al.*, 2016; MENDES, *et al.*, 2011). Embora ela seja amplamente empregada na produção de ésteres industriais, seu uso como biocatalisador na produção de ésteres de ácido gálico ainda é pouco explorada pela literatura especializada.

### 2.3 ENZIMAS EM MEIOS NÃO CONVENCIONAIS

No cenário da síntese orgânica, os químicos dispõem de um arsenal de catalisadores para utilizar em suas rotas sintéticas, como os catalisadores metálicos, organometálicos, organocatalisadores, catalisadores de transferência de fase e biocatalisadores, cada um deles oferecendo vantagens e desvantagens. Do ponto de vista da sustentabilidade ambiental o uso de biocatalisadores traz inúmeras vantagens (SHELDON *et al.*, 2018). Realizar reações em condições catalíticas, independentemente do tipo de catalisador empregado, é por si só uma vantagem sobre as reações em condições estequiométricas, conforme preconizado no 9º princípio da Química Verde (9 - Catálise: utilizar catalisadores que ajudem a aumentar a seletividade das reações, diminuir a geração de resíduos

reduzir o tempo reacional e demandas de energia) (TEIXEIRA *et al.*, 2020).

As enzimas são catalisadores naturais desenvolvidos naturalmente ao longo de anos e que permitem que a vida seja possível, através de rotas biossintéticas eficientes e seguras. Entretanto, elas evoluíram para catalisar determinadas reações com substratos naturais específicos e em condições reacionais fisiológicas, características essas muito diferentes daquelas muitas vezes exigidas para a produção em escala industrial dos compostos orgânicos de interesse comercial. (TEIXEIRA *et al.*, 2020). A biocatálise constitui uma tecnologia limpa, caracteriza processos considerados “verdes” e gera, portanto, produtos classificados como naturais, de forma a atender às exigências do mercado atual (SÁ *et al.*, 2017).

É importante enfatizar que a síntese orgânica ainda tem um longo caminho a percorrer antes de ser considerada competitiva com a biossíntese, a forma da natureza produzir moléculas. Os padrões naturais, ou seja, rendimento próximo à 100%, pouco ou nenhum desperdício, temperatura ambiente e meio aquoso devem ser aqueles que devemos buscar em nossos esforços para aperfeiçoar a capacidade sintética a fim de permitir mais aplicações de síntese orgânica (NICOLAOU, 2018). As reações de biotransformação catalisada por lipases normalmente são conduzidas em meios convencionais (meio aquoso) ou meios não-convencionais (meio orgânico). Entretanto, o uso de água como solvente em reações de biotransformação restringe a uma gama de aplicações da biocatálise, bem como limita a produtividade de diversos processos, principalmente os que envolvem substratos hidrofóbicos (AIRES; BARROS, 2002).

A principal razão para a utilização de meios não-convencionais é a possibilidade de solubilizar substratos e produtos hidrofóbicos, levando ao desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada, e a redução de possíveis efeitos inibitórios ou tóxicos pelo substrato ou produto. A seleção de solventes orgânicos deve ser efetuada de modo a permitir que o solvente atue como diluente, reduzindo a concentração interfacial na fase aquosa (por partição) de substratos ou produtos e o deslocamento do equilíbrio químico, sem interferir negativamente na atividade catalítica da enzima (AIRES; BARROS, 2002). Compreendendo as mudanças moleculares na estrutura enzimática e no mecanismo catalítico em meios de reação não-convencionais foi desenvolvido

muitos métodos complementares, desde a adição de agentes estabilizadores a abordagens de engenharia de proteínas altamente sofisticadas, para aumentar a estabilidade enzimática. (STEPANKOVA, 2013).

Os solventes são usados para a solubilização de reagentes, para facilitar a transferência de massa, solventes apolares são os mais empregados porque mantem a camada de hidratação das enzimas e a atividade proteica destas, em contrapartida, solventes polares podem reduzir a atividade catalítica de algumas enzimas por remover a camada de hidratação presente em sua estrutura, entretanto, o uso de substratos altamente polares como ácido gálico requer a aplicação destes solventes para a sua completa solubilização no meio de reação.

Diferentes solventes polares são empregados como meios de reação, como acetato de etila, piridina, acetona, terc-butanol entre outros. Dentre estes álcoois, selecionou-se o terc-butanol (álcool butílico terciário) como solvente para o desenvolvimento deste trabalho, afim de obter um sistema reacional homogêneo, ou seja, a completa solubilização dos materiais de partida e manutenção da atividade catalítica das lipases. Na síntese de ésteres, para que se obtenha maiores rendimentos de reação, o solvente deve conciliar a solubilidade do meio e a atividade da enzima, ou seja, o solvente deve ser suficientemente polar para que haja a solubilização e suficientemente apolar para não ocorrer a inativação da enzima (LIMA, 2013).

Geralmente as lipases são estáveis em solventes orgânicos, com algumas exceções de estimulação ou inibição. Os solventes não polares mudam o equilíbrio da forma fechada para a forma aberta, aumentando a atividade da lipase. Além disso, os solventes não polares modificam a solubilidade de substâncias no meio de reação, isso pode ter efeitos benéficos ou prejudiciais na estabilidade das lipases, dependendo da sua estrutura, da natureza do solvente orgânico e da reação. Por outro lado, os solventes orgânicos polares têm efeitos mais nocivos sobre a lipase, uma vez que este tipo de solvente pode remover algumas camadas essenciais de água da enzima, mudando a conformação nativa da lipase, por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (KUMAR, *et al.*, 2016; YAACOB, *et al.*, 2016).

## 2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas imobilizadas se apresentam como uma alternativa viável e prática, uma vez que a técnica de imobilização faz com que a atividade, a seletividade e a especificidade enzimática sejam otimizadas, além de aumentar a estabilidade estrutural e permitir a reciclagem e reutilização destas enzimas, resultando assim em um processo mais econômico e eficiente (NARWAL *et al.*, 2016). A utilização de enzimas em sua forma livre não é recomendada 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). Utilizada para aumentar a estabilidade das enzimas a imobilização é uma técnica que 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; SOLOMONS; THANGARAJ, 2019).

A imobilização também pode reduzir a inibição enzimática e aumentar suas condições operacionais (DAL, *et al.*, 2020). Além disso, a imobilização pode ser acoplada à purificação da enzima, dessa forma, a imobilização de enzimas é muito mais que uma ferramenta para recuperar e reutilizar as enzimas e se torna uma etapa crítica no projeto de biocatalisadores (BARBOSA, *et al.*, 2015) Algumas das principais vantagens das enzimas imobilizadas relativamente à sua forma solúvel são: as enzimas podem ser reutilizadas; os processos podem ser operados continuamente e controlados com facilidade; os produtos são facilmente separados; os problemas de efluentes e de manuseio são minimizados e em alguns casos as propriedades enzimáticas (atividade e estabilidade) podem ser alteradas favoravelmente pela imobilização.

Há diversos protocolos de imobilização que se diferenciam quanto ao tipo de suporte e sua eficiência, a escolha do suporte é muito importante, a hidrofobicidade ou hidrofília do suporte terá uma forte influência no comportamento de imobilização e na atividade catalítica da enzima imobilizada (HARTMANN; KOSTROV, 2013). Muitos protocolos de imobilização baseiam-se no confinamento da enzima em um

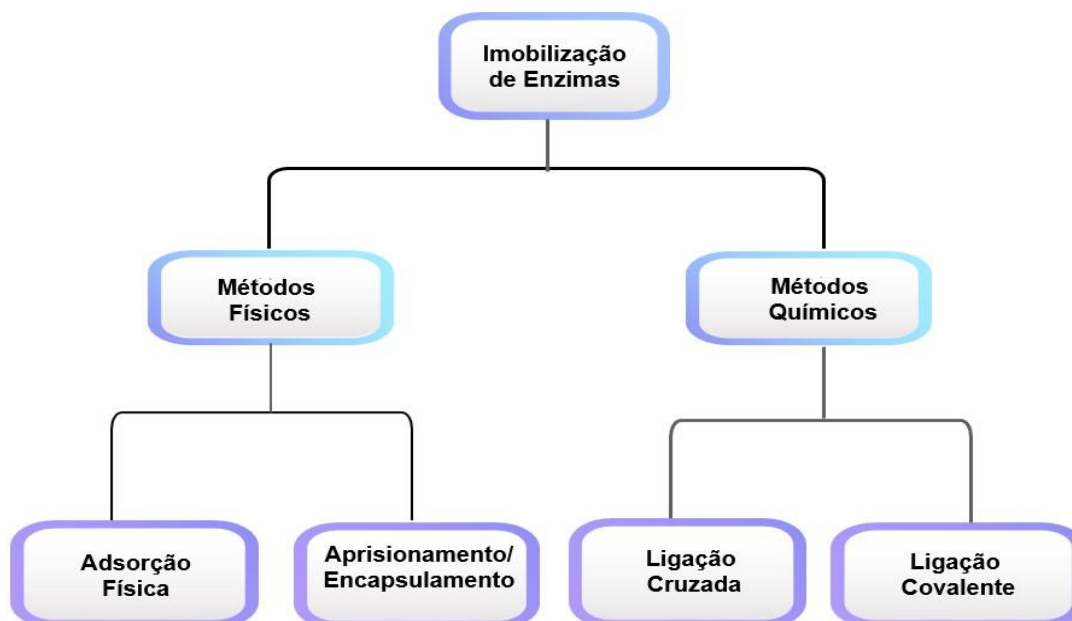
suporte sólido que pode ser poroso ou não criando um sistema de catálise heterogênea que possibilite a posterior reutilização do biocatalisador (ALVES, *et al.*, 2017). A seleção do suporte utilizado na imobilização de lipases é um ponto crucial na preparação de biocatalisadores heterogêneos, uma vez que, o mesmo deve apresentar alta atividade catalítica e mínima limitação difusional das moléculas dos reagentes e/ou produtos em seu microambiente (ALVES, *et al.*, 2017).

As principais características a serem observadas ao selecionar um suporte para uma determinada aplicação são a área de superfície, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia, composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, etc. Eles podem ser apresentados como suportes orgânicos e inorgânicos e também por sua morfologia como materiais porosos, não porosos e semelhantes a gel (CANTONE, *et al.*, 2013; SIRISHA, *et al.*, 2016).

Muitos métodos de imobilização foram desenvolvidos para a otimização dos processos, as técnicas de imobilização de enzimas podem ser divididas em métodos químicos e físicos. Os métodos químicos envolvem a formação de ligações covalentes obtidas pela ligação de éter, tio-éter, amida ou carbamato entre a enzima e o suporte ou através de ligações cruzadas entre a enzima e um agente reticulante.

Nos métodos físicos, a enzima se liga por adsorção, formando ligações mais fracas com o suporte de imobilização (ligações de hidrogênio, ligação por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações iônicas), ou também podem ser aprisionadas ou encapsuladas (FURLANI *et al.*, 2020). O fluxograma abaixo (Figura 2) representa as diferentes técnicas de imobilização de enzimas.

**Figura 2-** Representação das diferentes técnicas de imobilização de enzimas.



Fonte: O autor, 2022.

No processo de imobilização por ligação covalente acontece reação entre grupos nucleofílicos da enzima com grupos eletrofílicos do suporte, resulta em uma força de ligação muito forte entre a lipase e o suporte, apresentando uma alta estabilidade e evitando lixiviações, favorecendo o uso das lipases em condições extremas de temperaturas e pH. No entanto suas condições de preparo são rigorosas, podendo utilizar reagentes tóxicos, tornando os custos elevados (ABDULLA; DERMAN; SANNY, 2017).

Na imobilização por ligação iônica, as enzimas se ligam ao suporte que contenha íons residuais pela atração de íons com cargas opostas presentes em sua superfície. Portanto, essa imobilização causa menos alterações na conformação do sítio ativo das lipases, mantendo uma boa atividade na maioria dos casos, mas podendo ocorrer uma dessorção quando os meios de reação possuem presença de substratos de alta força iônica (MENDES, 2011; ZHAO, 2015). O tipo de imobilização por ligação cruzada oferece alta estabilidade, mas pode causar um alto impedimento pelo substrato, impossibilitando o mesmo de alcançar o sítio ativo da enzima (ZHOU, 2014).

A imobilização por aprisionamento ou encapsulamento baseia-se na captura das enzimas em uma rede de polímeros que permite a passagem de substratos e produtos, mas retém as enzimas. Após o aprisionamento, as lipases não são ligadas ao suporte e sua difusão é restrita (BADGUJAR *et al.*, 2017). O encapsulamento ou imobilização de células por aprisionamento em esferas tem recebido crescente atenção nos últimos anos, resultando em um grande número de aplicações biotecnológicas, agrícolas e na medicina. Em comparação com células livres em suspensão, a imobilização tem a vantagem da utilização contínua das células, além de promover a proteção das células imobilizadas (VILELA *et al.*, 2012).

O método mais utilizado de imobilização de lipases até o presente momento é a adsorção física, esse método possibilita uma grande variedade de técnicas, por ser o mais simples e pelo fato de retirarmos algumas vantagens de outros tipos de imobilização, como a reutilização do suporte depois da dessorção da enzima, algo que é vantajoso visando uma escala industrial. A imobilização de lipases pelo seu mecanismo específico de ativação interfacial em suportes hidrofóbicos possibilita mais vantagens do que se imobilizar enzimas em suportes de superfície não hidrofóbica (BASSI *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016). Por tais características e outras descritas logo abaixo, a adsorção física foi o método de imobilização selecionado para preparação dos biocatalisadores utilizados neste projeto.

## 2.5 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR ADSORÇÃO

Para as lipases serem bons catalisadores, a estabilidade operacional deve ser satisfatória e a atividade catalítica e conformação nativa da enzima pós imobilização não podem sofrer muitas alterações (BARBOSA *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2013).

A adsorção é uma das técnicas mais utilizadas na imobilização de lipases (MULINARI, *et al.*, 2020; ZHAO, *et al.*, 2019). A técnica baseia-se 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 e interações eletrostáticas (MULINARI, *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2019; ZHAO, *et al.*, 2019).

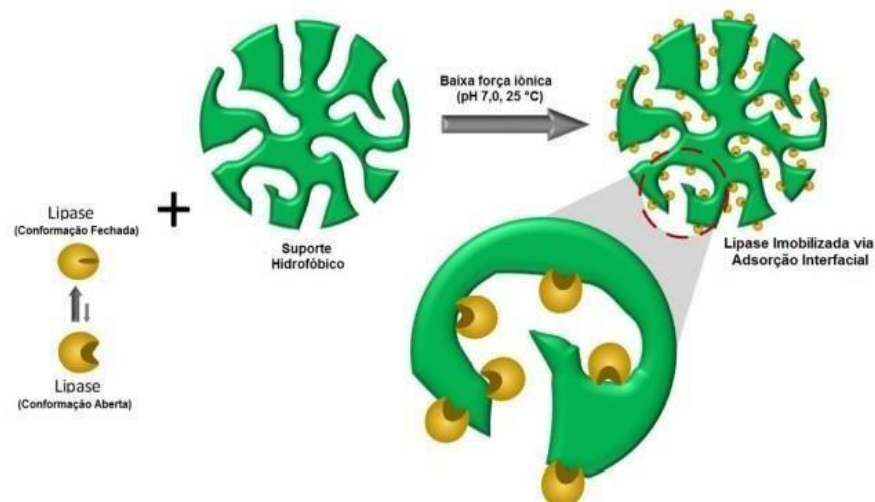
Em comparação com as outras técnicas, a imobilização por adsorção possui diversas vantagens, como condições simples no preparo do biocatalisador, a ausência de aditivos químicos durante a adsorção, a facilidade de regeneração do suporte e a alta atividade das lipases imobilizadas (ADLERCREUTZ, 2013; ALVES *et al.*, 2017; BOLINA, 2018; LAGE *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2019; MIGUEZ *et al.*, 2018).



A adsorção física é um método para preparar biocatalisadores heterogêneos amplamente usados na imobilização de lipases devido à sua simplicidade e baixo custo (HOMAEI, *et al.*, 2013; JESIONOWSKI, *et al.*, 2014; ZHAO, *et al.*, 2019). Ele preserva a conformação tridimensional da enzima, permite fácil reutilização do suporte por dessorção de enzimas inativas (JESIONOWSKI, *et al.*, 2014, REIS *et al.*, 2019; RODRIGUES, *et al.*, 2019; VIRGEN; ORTIZ, *et al.*, 2016), e promove a estabilização e melhoria da atividade catalítica (ADLERCREUTZ, 2013; ALVES *et al.*, 2017; BOLINA, *et al.*, 2018; JESIONOWSKI, *et al.*, 2014; LAGE *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2019). Este protocolo de imobilização é explicado por diferentes tipos de interações, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas, tal interação dependerá dos grupos funcionais presentes na superfície de suporte e da composição de aminoácidos presentes nas superfícies da lipase (BOLINA, *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2019, OKURA, *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2019).

O mecanismo de ativação interfacial está associado a mudanças conformacionais na enzima, uma propriedade estrutural particular de muitas lipases é a presença de uma “tampa” ou “lid” que pode mudar sua conformação de maneira a controlar o acesso das moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima. Essa tampa consiste em uma cadeia polipeptídica que possui duas conformações em meio aquoso, uma forma fechada em que o subdomínio cobre o sítio ativo de forma que a lipase se mantenha inativa e uma conformação aberta ou ativa em que o sítio ativo fica acessível às moléculas de substrato, esses rearranjos de conformação geralmente induzem a adsorção da enzima em uma interface hidrofóbica ou a um substrato de ligação (mecanismo de ativação interfacial). Normalmente, essas duas conformações da lipase estão em equilíbrio diretamente afetado pelas condições do meio (TAO *et al.*, 2014). A Figura 3 ilustra o mecanismo de ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos (Bassi *et al.*, 2016).

**Figura 3-** Mecanismo de ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos.



Fonte: Bassi *et al.*, 2016.

Os materiais porosos possuem uma grande área de superfície interna disponível para imobilização da enzima, onde é protegida dos efeitos da agitação vigorosa, uma vez que a maior parte da área disponível para imobilização está em sua estrutura interna, deve-se observar que o diâmetro dos poros deve ser grande o suficiente para acomodar a enzima e permitir o acesso para as moléculas do substrato (CANTONE, *et al.*, 2013; HANEFELD, *et al.*, 2009; MOHAMAD *et al.*, 2015). Os polímeros sintéticos exibem várias formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para preparar uma variedade de suportes. Os polímeros naturais são geralmente baratos, facilmente degradáveis e não prejudicam o meio ambiente. Entre os diferentes suportes orgânicos usados na imobilização de lipase, destacam-se a agarose (ZUCCA, *et al.*, 2016), hidrogéis de quitosana (VERMA *et al.*, 2020), resinas acrílicas (BASSI, *et al.*, 2016; LAGE, *et al.*, 2016; MANOEL, *et al.*, 2015; ORTIZ, *et al.*, 2019), polipropileno (BOSLEY, 1997), poli(estireno-divinilbenzeno) (ALVES, *et al.*, 2016; ALVES, *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Para este trabalho, selecionou-se como suporte o poli(estireno-divinilbenzeno), a seleção embasou-se à sua elevada área específica (500 m<sup>2</sup>/g) e diâmetros de poro (250 Å) que permite imobilizar alta concentração de proteína, um

importante requisito na preparação de biocatalisadores com alta atividade catalítica em meio orgânico (ALVES *et al.*, 2017; LAGE *et al.*, 2016).

Nos métodos físicos, a enzima quando ligadas por adsorção, formam ligações mais fracas com o suporte de imobilização (ligações de hidrogênio, ligação por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligação iônica) (FURLANI *et al.*, 2020), O método baseado em adsorção física na superfície dos suportes insolúveis em água (LIA, WU, 2008) causa pouca ou nenhuma mudança conformacional da estrutura da enzima ou destruição do seu sítio ativo. É um método simples e barato se for utilizado um suporte adequado (MIGUEZ, 2018).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, R.; SANNY, S. A.; DERMAN, E. Stability studies of immobilized lipase on rice husk and eggshell membrane. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, Sarawak, Malásia, v. 206, n. 1, 2017.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases inorganic media. **Chemical Society Reviews**, Lund, Suécia, v. 42, p. 6406-6436, 2013.
- AIRES-BARROS, M. R., Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, Portugal, v. 72, p. 2-13, 2002.
- ANGAJALA, G. PAVAN, P. UBASSHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis, **Biocatal. Agric. Biotechnol.** 7, Tamil Nadu, India, p. 257–270, 2016.
- AKACHA, N. B.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, Ariana, Tunísia, v. 94, p. 675-706, 2015.
- ALVES, M.D., ARACI, 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**. Belo Horizonte, Brasil, v.311, p.1-12,2017.
- ALVES, M.D. CREN, E. C., MENDES, A. A., Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **J MolCatal B Enzym** 133, Belo Horizonte, MG, Brasil, p. 377-387, 2016.
- AMARAL, A. B., SILVA, M.V., LANNES, S.C.S., Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors: a review. **Food Science and Technology**, São Paulo, SP, Brasil, v. 1, p. 38, 2018.
- ALLIED MARKET RESEARCH.; Enzymes Market Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, and Other Types), Source (Microorganisms, Plants, and Animals), Reaction Type (Hydrolase, Oxidoreductase, Transferase, Lyase, and Other Reaction Types), and Application (Food and Beverages, Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and Biotechnology, Feed, and Other Applications) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020–2027. Portland, 2020.  
Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em: 28 set. 2021.
- BADGUJAR, V. C.; Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on a polymeric film for synthesis of important fatty acid esters: kinetics and application studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Amalner, India, v. 40, n. 10, p. 1463–1478, 2017.

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

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R., Strategies for the One-Step Immobilization-Purification of Enzymes as Industrial Biocatalysts. *Biotechnol. Bucaramanga, Colômbia, Adv.*,33, p.435 - 456, 2015.

BASSI, J.J.; TODERO, L.M.; LAGE, F.A.P.; KHEDY, G.I.; DUCAS, J.D.; CUSTÓDIO, A.P., PINTO, M.A.; MENDES, A.A.; Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **Int. J. Biol. Macromol.**, Alfenas, MG, Brasil, v. 92, p. 900–909, 2016.

BASSO, A.; SERBAN, S., Industrial applications of immobilized enzymes – A review. **Molec. Catal.**, Llantrisant, Reino Unido, v. 479, 2019.

BERNAL, C., GUZMAN, F., ILLANES, A., WILSON, L., Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts. **Food Chem.**, La Serena, Chile, p. 239:189-195, 2018.

BILAL, M.; IQBAL, H.M.N., Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization, *Int. J. Biol. Macromol.* Huaian, China, v. 130, p. 462–482, 2019.

BOLINA, I. C. A.; GOMES, R. A. B., MENDES, A. A., Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: current scenario and future perspectives. **BioEnergy Res.** Belo Horizonte, MG, Brasil, v. 14, p. 1039-1057, 2021.

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

BOSLEY, J. A., PEILOW, A. D., Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading. *JAOCS*, **J Am Oil Chem Soc 74**, Bedford, Reino Unido, p. 107–111, 1997.

CANTONE, S., FERRARIO, V., CORICI, L., Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chem Soc Ver.** Veneza, Itália, v.42, p. 6262–6276, 2013.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, Aracaju, SE, Brasil, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014.

CAVALCANTI, E. D. C.; Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, Rio de Janeiro, Brasil, v. 215, p. 705–713, 2018.

- CERÓN, A. A.; VILAS BOAS, R. N.; BIAGGIO, F. C., CASTRO, H. F., Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass Bioenergy**, Lorena, SP, Brasil, v.119, p.166–172, 2018
- DAL, M. L., KORNECKI, J. F., KLEIN, M. P., RODRIGUES, R. C., FERNANDEZ-L. R.; Pectin Lyase Immobilization Using the Glutaraldehyde Chemistry Aumenta an Enzyme Operation Range. *Enzyme Microb. Technol.*, Porto Alegre, RS, Brasil, v. 132, 2020.
- FERNANDES, F.H.A., SALGADO, H.R.N.; Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Analytical Chemistry*. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**., Araraquara, SP, Brasil, p.1547-6510, 2015.
- FERNANDEZ, L. R.; Editorial for special issue: Enzyme immobilization and its applications. **Molecules**, Madrid, Espanha, v. 24, n. 24, p. 6–9, 2019.
- FURLANI, I. L.; AMARAL, B. S.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B., Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, São Carlos, SP, Brasil, v. 43, p.463-473, 2020.
- GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, Roma, Itália, v. 244, 2020.
- GOMES, A.; **Encapsulação de ácido gálico em sistemas emulsionados: efeito da composição das fases**. 140f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 2015.
- GUNSTONE, F.D., Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids, *J. Sci. Food Agric.* Dundee, Escócia, v. 79, p.1535–1549, 1999.
- GUTIERREZ, A.S.A.; GUO, J.; FENG, J.; TAN, L.; KONG, L. Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates. **Food Hydrocolloids**, Tuscaloosa, AL, EUA, v. 102, p. 105-603, 2020.
- HARTMANN, T.; KOSTROV, X.; Immobilization of enzymes on porous silicas – Benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, Erlangen, Alemanha, n. 15, p. 1-13, 2013.
- HANEFELD, U., GARDOSI, L., MAGNER, E.; Understanding enzyme immobilisation. **Chem Soc Rev** **38**, Delft, Holanda, p. 453–468, 2009.
- HE, WEN-SEN, LI, J.J., PAN, X.X., ZHOU, Y., JIA, S.C., ZHANG, X.M., FENG, B.; Lipase-mediated synthesis of water-soluble plant stanol derivatives in tert-butanol. **Bioresource Technology**, Jiangsu, China, v. 114, p. 1–5, 2012.
- ISMAIL, A. R.; BAEK, K. H.; Lipase immobilization with support materials, preparation, techniques and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, Gyeongbuk, República da Coreia, v. 163, p. 1624-1639, 2020.

JESIONOWSKI, T., ZDARTA, J., KRAJESWSKA, B.; Enzyme immobilization by adsorption: **A review. Adsorption**, Poznan, Polonia, v.20, p.801-821, 2014.

KESSLER, A.; KALSKE, A., Plant secondary metabolite diversity and species interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Nova York, EUA, v.49, p.115, 2018

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K.; Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, Mumbai, India, v. 50, n. 11, p. 1793–1806, 2015.

KUMAR, A., KHAN, A. MALHOTRA, S. MOSURKAL, R., DHAWAN, A., PANDEY, M.K., SINGH, B. K., KUMAR, R., PRASAD, A.K., SHARMA, S.K., SAMUELSON, L. A., CHOLLI, A.L., LEN, C., RICHARDS, N.G.J., KUMAR, J., HAAG, R., WATTERSON, A.C., PARMAR, V.S.; Synthesis of macromolecular systems via lipase catalyzed biocatalytic reactions: applications and future perspectives, **Chem. Soc. Rev.** Delhi, India, n. 45, p.6855–6887, 2016.

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* hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, Alfenas, MG, Brasil, v.84, p. 56-67, 2016.

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

LIMA, L. N.; **Síntese de ésteres catalisadas por lipases imobilizadas em diferentes suportes**. Departamento de engenharia química UFSCar, Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, SP, Brasil, 2013.

MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. N.; Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of Cleaner Production**, Jalandhar, India, v. 145, p. 114–133, 2017.

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**, Alfenas, MG, Brasil, v. 128, p. 9-21, 2019.

MANOEL, E.A., SANTOS, J.C.S., FREIRE, D. M. G., Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme Microb Technol** Rio de Janeiro, RJ, Brasil, v.71, p.53–57, 2015.

MENDES, A. A.; Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by different strategies. **Enzyme Research**, Alfenas, MG, Brasil, v. 2011, n. 1, 2011.

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

MENDONZA-ORTIZ, P. A., GAMA, R.S., GOMES, 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**, Belo Horizonte, MG, Brasil, 10, p.218, 2020.

MIGUEZ, J. P., **Produção de biolubrificante catalisado por lipase imobilizada via adsorção física em sílica de casca de arroz funcionalizada**. 78 f., 2018, Dissertação de mestrado. Departamento de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil, 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**, Alfenas, MG, Brasil, v. 139, p. 296-308, 2018.

MOHAMAD, N.R., MARZUKI, N. H. C., BUANG, N. A.; An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnol Equip**, Johor, Malásia, v. 29, p. 205–220, 2015.

MONTEIRO, R. R. C.; ARANA-PEÑA, S.; ROCHA, T. N.; MIRANDA, L. P.; BERENGUER-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**, Fortaleza, CE, Brasil, 2020.

MULINARI, J.; OLIVEIRA, J. V.; HOTZA, D.; Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. **Biotechnology Advances**, Florianópolis, SC, Brasil, v.42, p. 107-581, 2020.

NAGHDI, M. *et al.*; Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. **Environmental Pollution**, Québec, Canadá, v. 234, p. 190– 213, 2018.

NARWAL, S.K., GUPTA, R.; Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase, **Biotechnol. Lett.** Shimla, India, n.35 p.479–490, 2013.

NARWAL, S. K.; SAUN, N. K.; DOGRA, P.; GUPTA, R.; Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 69–73, 2016.

NELSON, D.L. & COX, M.M.; **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Rio Grande do Sul, Brasil, Artmed Editora, 2014.



NGUYEN, V. H; LE, M. N; NGUYEN, H. B; HA, K.O; PHAM, T. H. V; NGUYEN, T. H; DAO, N. S. H; NGUYEN, V. G; NGUYEN, D. L; TRINH, N.T.; Propyl gallate. Molbank, Hanói, Vietnã, p.1201, 2021.

NICOLAOU, K.C., O Surgimento e Evolução da Síntese Orgânica e por que é importante sustentá-la como um avanço da arte e da ciência para seu próprio bem. **Isr. J. Chem.** Texas, EUA, v. 58, p.104 – 113, 2018.

OKURA, N.S., SABI, G.J. CRIVELLENTI, M.C.; Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **Int J Biol Macromol**, Alfenas, MG, Brasil, 163, p.550–561, 2020.

ORTIZ, C., FERREIRA, M. L., BARBOSA, O., Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst. **Catal Sci Technol**, Bucaramanga, Colombia, v. 9, p. 2380–2420, 2019.

PUBCHEM. Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Resumo do composto PubChem para CID 370, ácido gálico.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid> . Acessado em 15 de novembro de 2021.

PUTON, B.M.S.; Síntese e avaliação das atividades biológicas e antioxidante de galato de geranila Dissertação de mestrado. Departamento de ciências agrárias-URI, Erechim, RS, Brasil, 2019.

QUÍMICA VERDE: fundamentos e aplicações; Corrêa, A. G., Zuin, V. G.; eds.; EdUFSCar: São Carlos, SP, Brasil, cap. 1, 2009.

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**, Fortaleza, CE, Brasil, v. 42, p. 768-783, 2019.

RAVI, A., BASKAR, G., NAVEENKUMAR, R., SUNITA, V., GNANSOUNOU, E., PANDEY, A., SIMMING, Y., JEGANNATHAN, K. R., PRAVEENKUMAR, R.; Contemporary approaches towards augmentation of distinctive heterogeneous catalyst for sustainable biodiesel production. **Environmental Technology & Innovationn**, Chennai, India, v.19, p.100-906, 2020.

RIOS, N.S.; PINHEIRO, B.B.; PINHEIRO, M.P.; BEZERRA, R.M.; SANTOS, J.C.S.; GONÇALVES, L.R.B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, Fortaleza, CE, Brasil, v. 75, p. 99–120, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.003>

RODRIGUES, R.C., BERENQUER, M.A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes, *Adv. Synth. Catal.* Madrid, Espanha, v. 353, p. 2216–2238, 2011.

RODRIGUES, R.C., HERNANDEZ, K., BARBOSA, O. immobilization of Proteins in Poly-Styrene-Divinylbenzene Matrices: Functional Properties and Applications. **Curr Org Chem**, Porto Alegre, RS, Brasil, v.19, p. 1707–1718, 2015.

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**, Porto Alegre, RS, Brasil, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C.; ARAÚJO, P. H. H.; OLIVEIRA D.; A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, Florianópolis, SC, Brasil, p. 95-105, 2017.

SCHAFRANSKI, K.; Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato. Dissertação de Mestrado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, PR, Brasil, p. 100, 2019.

SHELDON, R. A.; BRADY, D.; Os limites da biocatálise. **Chem. Commun.**; Delft, Holanda, v. 54, p. 6088, 2018.

SIRISHA, V.L., JAIN, N.; Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes, Mumbai, India, 1st ed. Elsevier Inc. 2016.

SOUMANOU, M.M., PÉRIGNON, M., VILLENEUVE, P.; Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: a review, **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** Montpellier, França, v. 115, p. 270–285, 2013.

SOUSA, R. R.; SILVA, A. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetic perspectives. **Catal. Sci. Technol.** Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p. 1-16, 2021.

STEPANKOVA, V., Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. **ACS Catalysis**, Brno, República Tcheca, v. 3, n. 12, p. 2823–2836, 2013.

STERGIOU, P. Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M., THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E., AFENDRA, A., PANDEY, A., PAPAMICHAEL, E. M.; Advances in lipase-catalyzed esterification reactions, **Biotechnol.** Ioannina, Grécia, Adv. 31, p. 1846, 2013.

TAO, Y., CUI, C., SHEN, H., LIU, L., CHEN, B., TAN, T.; Enhancing trimethylolpropane esters synthesis through lipase immobilized on surface hydrophobic modified support and appropriate substrate feeding methods. **Enzyme and Microbial Technology**. Beijing, China, p. 58-67, 2014.

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

TEIXEIRA, I. S.; MILAGRE, C. D.F.; Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores. **Química Nova**, Araraquara, SP, Brasil, v. 43, p. 773-786, 2020.

WOLF, V.G.; Ácido gálico e seus ésteres como agente anti-*Helicobacter pylori* e sequestradores de oxidantes produzidos por neutrófilos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de ciências farmacêuticas de Araraquara (UNESP), Araraquara, SP, Brasil, 2017.

WU, S.C.; LIA, Y.K.; Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Hsien, Taiwan, v. 54, p. 103-108, 2008

VERMA, M. L., KUMAR, S. A.; Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. **Environ Chem Lett**, Himachal Pradesh, India, v.18, p.315–323, 2020.

VILELA, A., SCHULLER, D., MENDES-FARIA, A., CORTES, M.R.; Redução da acidez volátil de vinho por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato-quitosano. **Revista Enologia**, p.38-42, 2012.

VIRGEN-ORTIZ, J.J., PEIRCE, S., TACIAS, V.G.P.; Reuse of anion exchangers as supports for enzyme immobilization: Reinforcement of the enzyme-support multiinteraction after enzyme inactivation. **Process Biochem.** Madrid, Espanha, v. 51, p.1391–1396, 2016.

YAACOB, N., KAMARUDIN, N.H.A., LEOW, A.T.C., SALLEH, A.B., RAHMAN, R.N.Z.R.A., ALI, M.S.M.; The role of solvent-accessible leu-208 of cold-active *Pseudomonas fluorescens* strain AMS8 lipase in interfacial activation, substrate accessibility and low-molecular weight esterification in the presence of toluene, **Molecules**. Serdang, Malásia, v. 22, 2017.

YAN, Y. ZHANG, X., CHEN, D.; Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on microporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids, **Bioresour. Technol.** Wuhan, China, v. 131, p. 179–187, 2013.

ZHANG, Y.; HE, S.; SIMPSON, B. K. Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current Opinion in Food Science**, Québec, Canadá, v. 19, p. 30–35, 2018.

ZHAO, M.T., ZHONG-YUAN, L., AO, L., ZHAO, G.H., HONG-KAI, X., ZHOU, Y., WANG, T.; Gallic acid and its alkyl esters emerge as effective antioxidants against lipid oxidation during hot air-drying process of *Ostrea talienwhanensis*. **LWT – Food Science and Technology**, Dalian, China, v. 139, p. 110-551, 2021.

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

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

ZHONG, L., FENG, Y., WANG, G., WANG, Z., BILAL, M., LV, H., CUI, J., Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: a review from the waste to biodiesel production, *Int. J. Biol. Macromol.* Tianjin, China, v. 152, p. 207–222, 2020.

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

ZUCCA, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. SANJUST, E., Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. *Molecules*. Monserrato, Itália, v. 21, p. 1–25, 2016.

## CAPÍTULO 2

### 3 ARTIGO: PRODUÇÃO DE ÉSTER DE ÁCIDO GÁLICO CATALISADA POR LIPASE *Pseudomonas fluorescens* IMOBILIZADA EM SUPORTE HIDROFÓBICO

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi a produção enzimática de um éster de ácido gálico (galato de isoamila) por esterificação de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de terc-butanol. O biocatalisador empregado foi preparado pela adsorção física de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) em partículas de poli(estireno-divinilbenzeno) (PEDB) via interações hidrofóbicas (mecanismo de ativação interfacial). A máxima concentração de proteína imobilizada de aproximadamente 33 mg/g<sup>-1</sup> de suporte foi obtido usando um carregamento inicial de proteína de 40 mg/g<sup>-1</sup>. A sua atividade catalítica na hidrólise da emulsão do azeite de oliva foi de aproximadamente 121,4 ± 5,5 U g<sup>-1</sup>. Este estudo mostrou que a LPF foi preferencialmente imobilizada na parte interna do suporte devido aos seus diâmetros de poro. O efeito de relevantes fatores na produção do éster foi avaliado por delineamento central composto rotacional (DCCR), nas condições ótimas, a máxima conversão foi de 55% após 90 minutos de reação obtida para a lipase imobilizada. Nestas mesmas condições a máxima conversão de apenas 37% foi observado para a lipase na forma livre. O biocatalisador preparado reteve aproximadamente 40% de sua atividade inicial após 5 bateladas consecutivas de reação. Este estudo mostra que um protocolo apropriado de imobilização pode melhorar o desempenho catalítico e reuso de lipases na produção de ésteres de interesse industrial em meios orgânicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Galato de isoamila, Esterificação, Lipase imobilizada, Adsorção física, Otimização.

## PRODUÇÃO DE ÉSTER DE ÁCIDO GÁLICO CATALISADA POR LIPASE *Pseudomonas fluorescens* IMOBILIZADA EM SUPORTE HIDROFÓBICO

PASSARI, F. A.<sup>1</sup>; PASSARI, G. J.<sup>2</sup>; PEREIRA, E. B.<sup>3</sup>; MENDES, A. A.  
Universidade Federal de Alfenas<sup>123</sup>

Artigo submetido em 02/2022 e aceito em xxxx/2022

DOI: 10.15628/holos.2016.xxxx

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi a produção enzimática de um éster de ácido gálico (galato de isoamila) por esterificação de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de terc-butanol. O biocatalisador empregado foi preparado por adsorção física de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) em partículas de poli(estireno-divinilbenzeno) (PEDB) via interações hidrofóbicas (mecanismo de ativação interfacial). A máxima concentração de proteína imobilizada de aproximadamente 33 mg g<sup>-1</sup> de suporte foi obtida usando um carregamento inicial de proteína de 40 mg g<sup>-1</sup>. A sua atividade catalítica na hidrólise da emulsão do azeite de oliva foi de aproximadamente 121,4 ± 5,5 U g<sup>-1</sup>. Este estudo mostrou que LPF foi preferencialmente imobilizada na parte interna do suporte devido aos seus

tamanhos de poro. O efeito de relevantes fatores na produção do éster foi avaliado por delineamento central composto rotacional (DCCR). Nas condições ótimas, a máxima conversão foi de 55% após 90 minutos de reação, obtida para a lipase imobilizada. Nestas mesmas condições, a máxima conversão de apenas 37% foi observado para a lipase na forma livre. O biocatalisador preparado reteve aproximadamente 40% de sua atividade inicial após 5 bateladas consecutivas de reação. Este estudo mostra que um protocolo apropriado de imobilização pode melhorar o desempenho catalítico e reuso de lipases na produção de ésteres de interesse industrial em meios orgânicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Galato de isoamila, Esterificação, Lipase imobilizada, Adsorção física, Otimização.

## PRODUCTION OF A GALLIC ACID ALKYL ESTER CATALYZED BY LIPASE FROM *Pseudomonas fluorescens* IMMOBILIZED ON A HYDROPHOBIC SUPPORT

### ABSTRACT

The aim of the present work was the enzymatic production of a gallic acid alkyl ester (isoamyl gallate) via esterification of gallic acid and isoamyl alcohol in a terc-butanol system. The biocatalyst used in this study has been prepared via physical adsorption by hydrophobic interactions (mechanism of interfacial activation) of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on polystyrene-divinylbenzene (PSty-DVB) beads. High enzyme loaded biocatalyst (immobilized protein concentration around of 33 mg g<sup>-1</sup> of support) was obtained using an initial protein loading of 40 mg g<sup>-1</sup>. Its hydrolytic activity (olive oil emulsion hydrolysis) was of 121.4 ± 5.5 U g<sup>-1</sup>. This study demonstrated that the lipase was preferentially adsorbed inside pore of the support. The effect of relevant factors

on ester production was assessed through a central composite rotatable design (CCRD). As a result, an acid conversion percentage of 55% was achieved at 30 °C using acid:alcohol molar ratio of 1:2.2 and 9% of mass of biocatalyst per volume of reaction (9% m v<sup>-1</sup>) after 90 min of reaction. Maximum acid conversion was only 37% using crude lipase extract under such experimental conditions. The biocatalyst retained ≈40% of its original activity after five consecutive esterification batches of 90 min each. These results show that a proper immobilization protocol may improve the catalytic performance and reusability of lipases in ester production via esterification in solvent systems.

**KEYWORDS:** Isoamyl gallate, Esterification, Immobilized lipase, Physical adsorption, Optimization.

## 1 INTRODUÇÃO

Ésteres de ácido gálico são uma importante classe de compostos com diferentes atividades biológicas tais como proteção cardiovascular, agentes antimicrobianos, antivirais, anticâncer, anti-inflamatórias e antioxidantes lipofílicos (Al Zahrani et al., 2020; Gutierrez et al., 2020; Zhao et al., 2020). O ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzóico) é um antioxidante natural obtido de diferentes fontes vegetais, porém sua alta polaridade dificulta a sua solubilidade em sistemas lipídicos, dessa forma, modificações químicas em sua molécula como a esterificação com diferentes álcoois podem melhorar sua lipofilicidade e contribuir com o aumento de sua solubilidade nestes meios (Al Zahrani et al., 2020; Gutierrez et al., 2020; Zhao et al., 2020). Além disso, vários estudos descritos na literatura mostram que alguns ésteres de ácido gálico (galatos de alquila) possuem propriedades biológicas melhores quando comparados com ácido gálico (Al Zahrani et al., 2020; Gutierrez et al., 2020). A introdução de cadeias carbônicas por esterificação tem sido realizada via catálise ácida ou enzimática (Al Zahrani et al., 2020; Gutierrez et al., 2020; Nguyen et al., 2021; Zhang et al., 2020).

A tecnologia convencional para a produção de ésteres de interesse industrial incluindo ésteres de ácido gálico, consiste principalmente na esterificação de ácidos graxos e álcoois de cadeias em temperaturas elevadas, acima de 70°C, e longos tempos de reação (entre 5h e 15h) empregando catalisadores homogêneos ácidos como HCl, HClO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e ácido *p*-tolueno sulfônico (Nguyen et al., 2021). Entretanto, a aplicação destes catalisadores químicos pode causar danos aos equipamentos industriais por serem altamente corrosivos, difícil separação do produto de interesse e a questão do problema ambiental com a descarga de águas residuais (Akerman et al., 2011; Ravi et al., 2020). Dessa forma, a substituição por processos enzimáticos torna-se altamente atrativa porque eliminam estes inconvenientes. As reações catalisadas por enzimas, dentre elas as lipases, ocorrem em condições brandas de temperatura e pressão e possuem elevada especificidade o que minimiza a geração de subprodutos e conseqüentemente, o volume de efluentes gerados nas etapas de recuperação e separação do produto de interesse (Adlercreutz, 2013; Basso; Serban, 2019; Fernandez- Lafuente, 2010). Lipases (triacilglicerol éster acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são uma importante classe de enzimas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol, monoglicerol e diacilglicerol. Estas enzimas também catalisam a produção de uma variedade de ésteres de interesse industrial por reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em ambientes com baixa concentração de água (Adlercreutz, 2013; Bolina et al., 2021; Fernandez-Lafuente, 2010). O grande interesse do setor industrial por esta classe de enzimas deve-se à sua capacidade de utilização em uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade frente à temperatura e solventes orgânicos e à sua elevada seletividade (Adlercreutz, 2013; Bolina et al., 2021; Fernandez- Lafuente, 2010; Rios et al., 2018).

A aplicação de lipases na forma livre (formulações em pó e líquidas) como catalisadores em meios orgânicos não é apropriada devido à formação de agregados por adsorção de moléculas polares produzidas no meio reacional como água e glicerol, além disso, a difícil recuperação do biocatalisador e a sua baixa atividade catalítica por influência de alguns solventes orgânicos, especialmente solventes polares, pode inviabilizar tecnicamente e economicamente a sua aplicação nestes sistemas reacionais (Bilal; Iqbal, 2019; Zhong et al., 2020). Portanto, a aplicação

de lipases em determinados processos indústrias só é atrativa na sua forma imobilizada empregando diferentes protocolos (Adlercreutz, 2013; Bilal; Iqbal, 2019; Monteiro et al., 2020; Rios et al., 2018; Zhong et al., 2020). A adoção de protocolos de imobilização é uma importante estratégia para a estabilização das estruturas tridimensionais dessas enzimas, possibilitam fácil recuperação do meio de reação e posterior reuso, reduz a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos e facilita a separação/purificação do produto de interesse ao final do processo (Adlercreutz, 2013; Bilal, Iqbal, 2019; Bolina et al., 2021; Rodrigues et al., 2019; Zhong et al., 2020).

Diferentes protocolos são propostos na imobilização de lipases como: (i) adsorção por ligação de hidrogênio, interações iônicas ou hidrofóbicas, (ii) ligação covalente, (iii) encapsulação, (iv) reticulação pela técnica CLEA (*cross-linked enzyme aggregates*), (v) técnica PCMC (*protein-coated micro-crystals*), e (vi) a combinação destas diferentes técnicas (Adlercreutz, 2013; Bilal; Iqbal, 2019; Bolina et al., 2021; Monteiro et al., 2020; Rodrigues et al., 2019; Zhong et al., 2020). Entretanto, o protocolo mais empregado na imobilização de lipases é a adsorção física em suportes hidrofóbicos, conhecido como “mecanismo de ativação interfacial” (Adlercreutz, 2013; Rodrigues et al., 2019). As enzimas possuem uma cadeia polipeptídica hidrofóbica (denominada “*lid*” ou “tampa”) que cobre seus sítios ativos, em meio aquoso, pois os sítios ativos encontram-se inacessíveis ao substrato (conformação “fechada”). Na presença de uma superfície hidrofóbica como gotículas de óleo ou suportes hidrofóbicos este equilíbrio desloca-se para a sua conformação “aberta”. Dessa forma, as lipases são imobilizadas em matrizes hidrofóbicas na sua conformação “aberta” porque reconhecem estas superfícies de forma semelhante aos seus substratos naturais (gotículas de óleo) (Adlercreutz, 2013; Bolina et al., 2021; Fernandez-Lafuente, 2010; Rodrigues et al., 2019). A imobilização de lipases na conformação aberta possibilita a preparação de biocatalisadores heterogêneos com alta atividade catalítica e estabilidade após sucessivos ciclos de reação (Bolina et al., 2021; Rodrigues et al., 2019).

Uma grande variedade de suportes hidrofóbicos naturais ou sintéticos (orgânicos, inorgânicos ou mistos) tem sido empregada na imobilização de lipases pelo mecanismo de ativação interfacial, como polipropileno, resinas acrílicas, agarose funcionalizada, sílica funcionalizada com diferentes agentes silanos e líquidos iônicos, carvão ativado, materiais lignocelulósicos, partículas magnéticas, poli(estireno-divinilbenzeno) (PEDB), dentre outros (Bilal; Iqbal, 2019; Bolina et al., 2021; Rodrigues et al., 2015; Rodrigues et al., 2019; Zhong et al., 2020). A extensiva aplicação de partículas de poli(estireno-divinilbenzeno) deve-se às suas excelentes propriedades físicas como elevada área superficial e diâmetro de poros que permitem imobilizar altos carregamentos de enzimas em suas superfícies interna e externa, um importante requisito na preparação de biocatalisadores heterogêneos com alta atividade catalítica e estabilidade na produção de ésteres de interesse industrial (Alves et al., 2016; Carvalho et al., 2021; Rodrigues et al., 2015).

Neste contexto, o principal objetivo deste estudo consistiu na produção enzimática de um éster de ácido gálico em meio orgânico. Para a execução do presente estudo, foi empregado álcool isoamílico, este álcool foi selecionado devido à sua fácil obtenção e por ser proveniente do setor sucroalcooleiro (fonte renovável), principal constituinte do óleo fúsel – 65% m/m (Mendoza; Pedroza et al., 2021). O óleo fúsel é uma mistura constituída por diferentes álcoois superiores como propanol, isobutanol, amílico, isoamílico dentre outros – é a fração menos volátil obtida na destilação do etanol (Cerón et al., 2018; Mendoza; Pedroza et al., 2021). Em 2019, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de óleo fúsel com uma produção da ordem de 163 milhões de



litros (Mendoza; Pedroza et al., 2021). As reações foram conduzidas em meio de terc-butanol, um solvente orgânico amplamente empregado como meio de reação para a produção enzimática de ésteres (He et al., 2012; Lima et al., 2018; Vescovi et al., 2016). Neste estudo, a lipase microbiana *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi selecionada devido à sua alta atividade catalítica em meios orgânicos (ausência e presença de solventes) para a produção de ésteres por diferentes rotas, em especial transesterificação e esterificação (Rios et al., 2018). Esta preparação de lipase na forma em pó é disponibilizada pela Merck & Co. com o nome comercial de Amano AK. O desempenho catalítico desta lipase na esterificação de ácido gálico com álcool isoamílico foi determinado nas suas formas em pó (lipase livre) e imobilizada, a imobilização da lipase foi realizada por adsorção hidrofóbica em partículas de poli-(estireno-divinilbenzeno), um suporte comercial com elevada área superficial específica e diâmetro de poros, amplamente empregado na preparação de biocatalisadores com alta atividade catalítica na produção de ésteres (Alves et al., 2017; Lage et al., 2016). O efeito de relevantes fatores na produção do éster como temperatura de reação, razão molar ácido:álcool e concentração de lipase imobilizada foi avaliado por um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR), uma ferramenta estatística amplamente empregada na otimização de processos industriais. Nas condições ótimas, foi avaliado o efeito do tempo de reação na produção do éster empregando o biocatalisador preparado (LPF imobilizada em PEDB) e comparado com a lipase na forma livre, por fim, foram conduzidos testes de reuso do biocatalisador preparado em sucessivas bateladas de reação. É importante salientar que a estratégia proposta neste estudo ainda não é reportada na literatura especializada e a sua execução possibilitará propor um processo tecnologicamente limpo por se tratar da aplicação de materiais de partida renováveis e biocatalisadores para a produção de compostos de interesse industrial.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A preparação de lipase de *Pseudomonas fluorescens* – LPF (Amano AK) foi adquirida da Merck & Co. (St. Louis, MO, EUA). Partículas de poli(estireno-divinilbenzeno) – PEDB (Diaion<sup>®</sup> HP 20) com área superficial específica de 500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> e diâmetro de poro de 260 Å foram adquiridas da Supelco (Bellefonte, EUA). Ácido gálico e álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) foram também adquiridos da Merck & Co. Os demais produtos químicos e solventes orgânicos como terc-butanol foram de grau analítico adquiridos da Synth<sup>®</sup> e Vetec Química Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

### 2.2 Preparação do biocatalisador por imobilização da lipase no suporte hidrofóbico

A imobilização de LPF em partículas de PEDB foi realizada de acordo com estudos realizados em nossa equipe de pesquisa (Bassi et al., 2016; Alves et al., 2017; Carvalho et al., 2021). O procedimento de adsorção consistiu na preparação de uma suspensão contendo solução de lipase preparada em tampão acetato de sódio pH 5,0 (força iônica de 5 mmol L<sup>-1</sup>) na proporção suporte:solução enzimática de 1:20. Foi empregado um carregamento de 40 mg de proteína de suporte com a finalidade de preparar um biocatalisador heterogêneo com alta atividade catalítica (Bassi et al., 2016; Carvalho et al., 2021). A suspensão foi mantida em agitação mecânica em shaker orbital a 200 rpm por 18 horas de contato a 25°C. Após este período o biocatalisador preparado foi filtrado sob vácuo em funil de Buchner com papel de filtro Whatman n°41 e lavado com água

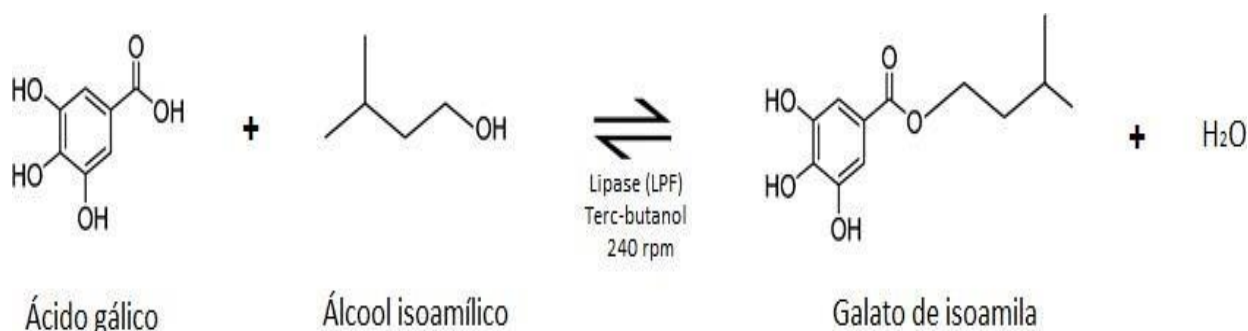
destilada para a remoção de enzimas não adsorvidas. O processo de adsorção foi monitorado pela determinação da concentração de proteína desaparecida no sobrenadante de imobilização (PI – mg g<sup>-1</sup>) conforme metodologia proposta por Bradford (Bradford, 1976). A atividade hidrolítica da lipase (HA – U g<sup>-1</sup>) foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva (Bassi et al., 2016; Alves et al., 2017; Carvalho et al., 2021). Uma unidade de atividade (U) corresponde a massa de biocatalisador necessária para liberar 1 μmol de ácidos graxos por minuto de reação em tampão fosfato de sódio pH 8,0 (100 mmol L<sup>-1</sup>), 37°C e 200 rpm (Alves et al., 2017). A atividade específica (AE – U mg<sup>-1</sup>) foi determinada pela relação entre a atividade hidrolítica e a concentração de proteína (Bassi et al., 2016; Carvalho et al., 2021). Ao final o biocatalisador preparado foi filtrado a vácuo, lavado com tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mmol L<sup>-1</sup>) e estocado a 4°C.

### 2.3 Produção enzimática do éster por esterificação em meio de terc-butanol

A produção de galato de isoamila por reação de esterificação em meio de terc-butanol, como mostrado na Figura 1, foi conduzida em frascos fechados (frascos de Durán de 125 mL) contendo 5 mL de meio de reação empregando concentração fixa de ácido gálico (250 mmol L<sup>-1</sup>). Após o preparo da solução de materiais de partida foi adicionado o biocatalisador (lipase) e as suspensões foram mantidas em contínua agitação em shaker orbital (240 rpm). Amostras foram periodicamente retiradas da mistura reacional (100 μL), diluídas em 10 mL de solução de etanol (95% m m<sup>-1</sup>) e tituladas com solução de NaOH (30 mmol L<sup>-1</sup>) utilizando fenolftaleína como indicador para determinar a concentração de ácido gálico residual. A determinação da porcentagem de conversão do ácido (Y) foi realizada conforme mostrada na Eq. (1) (Lage et al., 2016; Alves et al., 2017):

$$Y(\%) = \left( \frac{A_0 - A_f}{A_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que:  $A_0$  é a concentração inicial de ácido gálico na reação (mmol L<sup>-1</sup>) e  $A_f$  é a concentração de ácido residual após um determinado tempo de reação (mmol L<sup>-1</sup>).



**Figura 1: Esquema representativo de produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio orgânico.**

## 2.4 Otimização da produção enzimática do éster por delineamento estatístico

A produção enzimática do éster (galato de isoamila) foi otimizada por um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^3$ . Este delineamento proposto consistiu de 18 ensaios nos quais quatro foram conduzidos no ponto central (valor codificado: 0), seis nos pontos axiais (valores codificados: -1,68 e +1,68) e oito nos pontos fatoriais (valores codificados: -1 e +1). Os níveis de cada variável foram escolhidos baseados em trabalhos previamente publicados na literatura especializada (Miguez et al., 2018; Mendoza-Ortiz et al., 2020; Guedes Jr. et al., 2022). As reações de esterificação foram realizadas em ordem aleatória, mantendo-se fixa a agitação (240 rpm), concentração de ácido gálico ( $250 \text{ mmol L}^{-1}$  em meio de terc-butanol), e tempo de reação (60 min). Os parâmetros estudados e seus níveis foram: concentração de biocatalisador (5% a 25% em massa de LPF-PEDB por volume de meio de reação – 5% a 25%  $\text{m v}^{-1}$ ), temperatura de reação ( $25^\circ\text{C}$  a  $70^\circ\text{C}$ ) e razão molar ácido:álcool (1:0,4 a 1:4). Como variável resposta foi determinada a porcentagem de conversão do ácido conforme descrito acima (ver Eq. (1)).

Os resultados experimentais foram analisados ao nível de 95% de confiança utilizando o *software* Statistica versão 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). A significância do modelo foi avaliada pela análise de variância (ANOVA).

## 2.5 Efeito do tempo de reação na produção enzimática do éster: Estudo comparativo entre lipase na forma livre e imobilizada

Nas condições ótimas determinadas por DCCR (concentração de lipase imobilizada de 9% em massa por volume de meio de reação – 9%  $\text{m v}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , 240 rpm e razão molar ácido:álcool de 1:2,2 em meio de terc-butanol contendo  $250 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido gálico), foi avaliado o efeito do tempo de reação na produção do éster. Este ensaio foi conduzido com a finalidade de determinar o tempo mínimo necessário para alcançar a máxima porcentagem de conversão, o desempenho catalítico da lipase imobilizada foi comparado com a enzima livre (lipase em pó) empregando a mesma concentração de proteína – 9%  $\text{m v}^{-1}$  de lipase imobilizada (0,45g de biocatalisador) contendo 15mg de proteína imobilizada que corresponde a 0,72g de lipase em pó.

## 2.6 Testes de reuso do biocatalisador preparado em sucessivas bateladas de reação

Os testes de estabilidade operacional (reuso) da lipase imobilizada após 5 sucessivas bateladas de esterificação de 90 minutos cada foram realizados nas condições ótimas de reação, após cada batelada de reação o biocatalisador preparado (lipase imobilizada) foi recuperado por filtração a vácuo, lavado com hexano gelado para a remoção de materiais de partida não convertidos e produtos adsorvidos nas partículas e secado sob vácuo a  $25^\circ\text{C}$  por 3h. Após este procedimento o biocatalisador foi adicionado em um novo meio reacional.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Caracterização do biocatalisador preparado

As propriedades do biocatalisador preparado (LPF imobilizada em PEDB) foram determinadas e comparadas com a enzima na forma livre, este estudo foi realizado para avaliar o

efeito do processo de imobilização na atividade catalítica da enzima e os resultados estão sumarizados na Tabela 1.

Conforme pode ser observado o biocatalisador preparado (lipase imobilizada) possui uma maior concentração de proteína por grama de sólido devido à alta capacidade de adsorção do suporte testado (elevada área superficial específica e diâmetro de poro) conforme descrito anteriormente. Isso é interessante do ponto de vista industrial porque o volume ocupado pelo biocatalisador no reator é de aproximadamente 40% menor se comparado com a lipase na forma livre. Com relação à atividade catalítica na hidrólise da emulsão de azeite de oliva (um protocolo clássico na determinação de atividade de lipases em meio aquoso) a lipase na forma livre (HA = 8611,2 aproximadamente 184,9 U g<sup>-1</sup> de sólido) possui uma atividade bastante superior à lipase na forma imobilizada (HA = 121,4 aproximadamente 5,5 U g<sup>-1</sup> de sólido). Pode-se notar também uma drástica redução da atividade específica da enzima após o procedimento de imobilização, de 414,0 U mg<sup>-1</sup> de proteína para 3,7 U mg<sup>-1</sup> de proteína, este acentuado decréscimo nos valores de atividade hidrolítica e específica sugere um restrito acesso de gotículas de óleo aos sítios ativos da enzima após a imobilização, este resultado é devido à imobilização da lipase na parte interna do suporte. Imobilização de moléculas de enzima na superfície interna do suporte é benéfica ao processo porque aumenta a estabilidade de lipases por influência do solvente, temperatura de reação e minimiza possível dessorção da enzima após sucessivas bateladas, fatores importantes para a obtenção de biocatalisadores altamente estáveis (Rodrigues et al., 2019). O desempenho catalítico da lipase imobilizada (biocatalisador preparado neste estudo) foi também avaliado na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol por esterificação, mostrado a seguir.

**Tabela 1: Estudo comparativo das propriedades de LPF nas formas livre e imobilizada.**

Lipase	Parâmetros		
	Proteína (mg g <sup>-1</sup> )	Atividade hidrolítica (U g <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U mg <sup>-1</sup> )
Livre	20,8 ± 0,3	8611,2 ± 184,9	414,0
Imobilizada	33,2 ± 0,4	121,4 ± 5,5	3,7

### 3.2 Otimização da produção de éster

Os efeitos de importantes parâmetros na produção enzimática do éster foi avaliado neste estudo, de acordo com os resultados sumarizados na Tabela 2, a porcentagem de conversão do ácido variou de 20,5% (Ensaio 14) a aproximadamente 50% (Ensaios 4, 5, 6 e 7) após 60 minutos de reação. As reações conduzidas nos valores máximos de conversão da ordem de 50%, foram conduzidas nos pontos fatoriais entre os níveis codificados de -1 e +1 no planejamento proposto. Estes valores correspondem à concentração de biocatalisador variando de 9% m v<sup>-1</sup> a 21% m v<sup>-1</sup>, temperatura de reação entre 30°C e 60°C e razão molar ácido:álcool de 1:1,13 a 1:3,27. Estes ensaios foram analisados entre si para a determinação das condições ótimas de reação. Conforme pode ser observado a máxima porcentagem de conversão do ácido foi obtida com concentração de biocatalisador de 9% m v<sup>-1</sup> de meio de reação (valor codificado: -1) e temperatura de 30°C

Embora a reação conduzida na presença de um ligeiro excesso de álcool isoamílico no meio de reação (razão molar ácido:álcool de 1:1,13 – valor codificado: -1) tenha possibilitado obter máxima conversão, a produção do éster nos níveis codificados de -1 para todas estas variáveis alcançou máxima conversão de apenas 41,5% (Ensaio 1 na Tabela 2). Esterificação é um processo termodinamicamente controlado e o aumento da concentração de um dos materiais de partida no meio de reação desloca o equilíbrio químico para a formação de produto (Carvalho et al., 2021; Guedes Jr. et al., 2022) consequentemente estes resultados sugerem que máxima concentração de éster pode ser obtida para reações conduzidas com excessos de álcool isoamílico, ou seja, razão molar ácido:álcool acima de 1:1,13 (valor codificado acima de -1). Reações de esterificação nos pontos centrais também permitiram obter valores de conversão bastante similares aos valores descritos acima (Ensaio 15, 16, 17, 18 – valores de conversão da ordem de 45%), estes resultados mostram que a reação conduzida com concentração de biocatalisador de 9% m v<sup>-1</sup> e 30°C são suficientes para obter máxima produção do éster.

**Tabela 2: Planejamento de experimentos para a produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio de terc-butanol após de 60 min de reação.**

Ensaio	Variáveis independentes Valores codificados (reais)			Conversão (%)
	Concentração de biocatalisador (% m v <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Razão molar ácido:álcool	
1	-1 (9)	-1 (30)	-1 (1:1,13)	41,5
2	+1 (21)	-1 (30)	-1 (1:1,13)	42,3
3	-1 (9)	+1 (60)	-1 (1:1,13)	28,9
4	+1 (21)	+1 (60)	-1 (1:1,13)	52,0
5	-1 (9)	-1 (30)	+1 (1:3,27)	51,5
6	+1 (21)	-1 (30)	+1 (1:3,27)	49,5
7	-1 (9)	+1 (60)	+1 (1:3,27)	49,9
8	+1 (21)	+1 (60)	+1 (1:3,27)	42,9
9	-1,68 (5)	0 (45)	0 (1:2,2)	31,2
10	+1,68 (25)	0 (45)	0 (1:2,2)	34,3
11	0 (15)	-1,68 (20)	0 (1:2,2)	31,0
12	0 (15)	+1,68 (70)	0 (1:2,2)	40,9
13	0 (15)	0 (45)	-1,68 (1:0,4)	29,3
14	0 (15)	0 (45)	+1,68 (1:4)	20,5
15	0 (15)	0 (45)	0 (1:2,2)	47,4
16	0 (15)	0 (45)	0 (1:2,2)	43,7
17	0 (15)	0 (45)	0 (1:2,2)	47,0
18	0 (15)	0 (45)	0 (1:2,2)	44,8

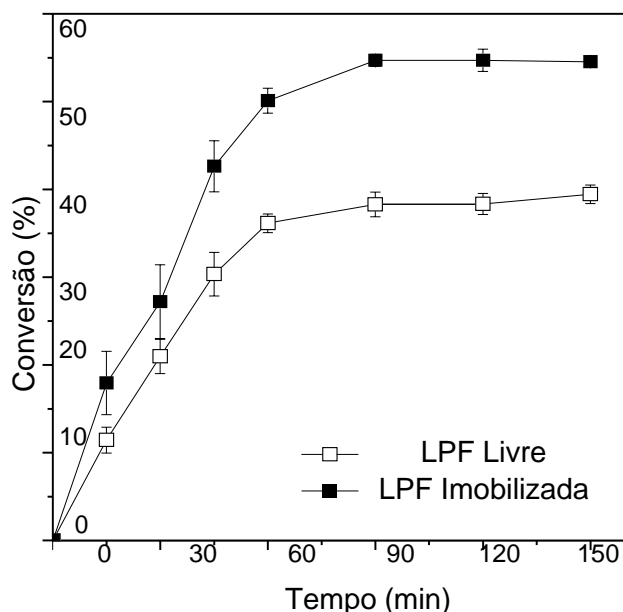
Estes resultados foram analisados pelo *software* Statistica e de acordo com a análise de variância, o modelo gerado não foi apropriado para a geração das superfícies de resposta –  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$  (dados não mostrados) porém isso não invalida a análise estatística e a análise dos dados experimentais obtidos.

Mesmo sem a construção de superfícies de respostas foi possível encontrar uma condição experimental capaz de obter a máxima produção do éster pela análise dos dados descritos na Tabela 2 (concentração de lipase imobilizada de 9% em massa por volume de meio de reação – 9%  $\text{m v}^{-1}$ , 30°C, e razão molar ácido:álcool acima de 1:1,13). Com relação aos valores de razão molar ácido:álcool testes subsequentes foram realizados com valores no ponto central – 1:2,2 (valor codificado: 0) e no ponto axial de 1:3,27 (valor codificado: +1) mantendo-se fixa a concentração de biocatalisador (9%  $\text{m v}^{-1}$ ) e temperatura de reação (30°C). De acordo com os resultados obtidos, similar porcentagem de conversão entre 48% e 50% após 60 minutos de reação foram obtidas nas razões molares ácido:álcool de 1:2,2 e 1:3,27.

Dessa forma, a máxima produção de galato de isoamila foi alcançada com concentração de biocatalisador de 9%  $\text{m v}^{-1}$  (valor codificado: -1), temperatura de reação de 30°C (valor codificado: -1) e razão molar ácido:álcool de 1:2,2 (valor codificado: 0), estas condições foram empregadas para a avaliação do tempo de reação na produção do éster.

### 3.3 Efeito do tempo de reação na produção de éster

Após a etapa de otimização do processo foi avaliado o efeito do tempo de reação na produção do éster, neste estudo a esterificação catalisada pela lipase na forma livre foi também realizado para mostrar o efeito da imobilização na atividade catalítica da enzima em meio orgânico. Para a realização destes testes foi empregada a mesma concentração de proteína imobilizada para as duas formas do biocatalisador – 15 mg de proteína para 5 mL de solução de materiais de partida em meio de terc-butanol que equivale a 0,45 g da lipase imobilizada (9%  $\text{m v}^{-1}$ ) e 0,72 g de lipase em pó. Conforme pode ser observado na Figura 2 a máxima conversão da ordem de 55% após 90 minutos de reação foi obtida para a enzima na forma imobilizada, nestas mesmas condições experimentais a máxima conversão para a lipase livre foi inferior a 40%.



**Figura 2: Efeito do tempo de reação na produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio orgânico catalisada por LPF na forma livre e imobilizada em PEDB.**

Estes resultados mostram que o processo de imobilização melhorou a atividade catalítica da enzima em meio orgânico, isto se deve preferencialmente a imobilização da lipase na superfície do suporte na sua conformação aberta o que possibilita melhor acesso dos materiais de partida aos sítios ativos da enzima (Carvalho et al., 2021; Guedes Jr. et al., 2022). No entanto, a lipase na forma livre está na sua forma agregada (conformação fechada) que dificulta o acesso de moléculas de matérias-primas ao microambiente da enzima. Estes resultados mostram que o processo de imobilização melhora a dispersão de moléculas de lipase na superfície do suporte, este comportamento tem sido observado em outros estudos descritos na literatura especializada quando se compara o desempenho catalítico de lipases nas formas livre e imobilizada em reações em meios orgânicos (Lage et al., 2016; Carvalho et al., 2021; Guedes Jr. et al., 2022). Consecutivamente, testes de reuso após 5 sucessivas bateladas de reação foram realizados para o biocatalisador na forma imobilizada.

### 3.4 Testes de reuso do biocatalisador preparado em sucessivas bateladas de reação

A estabilidade do biocatalisador preparado foi avaliada após cinco sucessivas bateladas de esterificação de 90 minutos cada nas condições previamente otimizadas. Os valores de porcentagem de conversão do ácido após sucessivos reusos são reportados na Figura 3. Pode-se observar um decréscimo de atividade catalítica após cinco bateladas de reação, isto pode ser devido ao acúmulo de água produzida na reação que pode favorecer a dessorção de algumas moléculas de lipase da superfície do suporte, além disso, a inativação por efeito da temperatura e solvente orgânico (terc-butanol) também pode influenciar negativamente na atividade catalítica da enzima (Lage et al., 2016). De fato, a máxima conversão de 22% foi obtida na quinta batelada de reação, este valor corresponde a 40% da atividade inicial (primeira batelada de reação).

Embora um acentuado decréscimo de atividade após consecutivas bateladas de reação tenha sido observado, o biocatalisador possui propriedades interessantes devido à sua fácil separação do meio de reação e reuso além de satisfatória atividade catalítica comparando-se com a lipase livre.

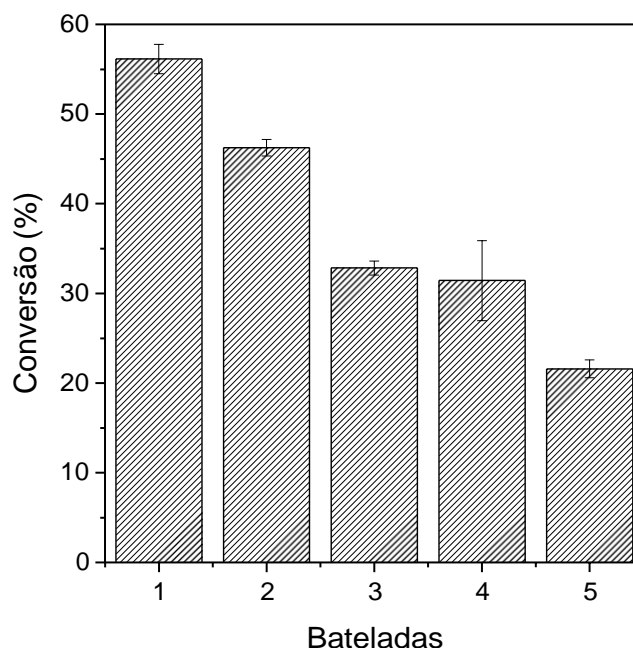


Figura 3: Testes de reuso do biocatalisador preparado (lipase imobilizada) após sucessivas bateladas de reação conduzidas nas condições experimentais otimizadas.

#### 4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o poli(estireno-divinilbenzeno) é um suporte adequado para a preparação de biocatalisadores com alta atividade catalítica devido à sua alta capacidade de adsorção, o processo de imobilização da lipase reduziu a sua atividade catalítica na reação de hidrólise devido à adsorção da enzima na superfície interna do suporte (limitação difusional de gotículas de óleo aos sítios ativos da enzima imobilizada nos poros do material). Por outro lado, o processo de imobilização foi benéfico na reação de produção de éster de ácido gálico (galato de isoamila) em meio de terc-butanol. A atividade catalítica da lipase imobilizada foi superior à sua forma livre porque o processo de imobilização possibilitou excelente acesso de moléculas de materiais de partida (ácido gálico e álcool isoamílico) aos seus sítios ativos devido à baixa massa molecular destes materiais. Isto sugere boa difusão de pequenas moléculas nos poros do biocatalisador preparado, a máxima porcentagem de conversão na ordem de 55% foi obtida após 90 minutos de reação nas condições experimentais ótimas (concentração de biocatalisador de 9% m v<sup>-1</sup>, 30°C e razão molar ácido:álcool de 1:2,2). Nestas mesmas condições, a máxima conversão de apenas 37% foi obtido para a lipase na forma livre. Testes de reuso do biocatalisador em sucessivas bateladas de reação mostram um acentuado decréscimo de sua atividade catalítica (conversão da ordem de 22% na quinta batelada). Estes resultados sugerem estudos adicionais com a finalidade de aumentar a estabilidade com o recobrimento do biocatalisador com polímeros orgânicos como polietilenoimina ou polietilenoglicol para minimizar efeitos de distorção na estrutura tridimensional da enzima ou dessorção.



## 5 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - pelo suporte financeiro. Passari, F. A. agradece à FAPEMIG pela concessão da bolsa de mestrado.

## 6 REFERÊNCIAS

- Akerman, C.O.; Gaber, Y.; Ghani, N.A.; Lämsä, M.; & Hatti-Kaul, R. (2011). Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, p. 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.014>
- Alves, M.D.; Cren, E.C.; & Mendes, A.A. (2016). Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, p. S377–S387. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.02.011>
- Alves, M.D.; Aracri, F.M.; Cren, E.C.; & Mendes, A.A. (2017). Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal*, v. 311, p. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.069>
- Al Zahrani, N.A.; El-Shishtawy, R.M.; & Asiri, A.M. (2020). Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 204, p. 112609. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>
- Bassi, J.J.; Todero, L.M.; Lage, F.A.P.; Khedy, G.I.; Ducas, J.D.; Custódio, A.P.; Pinto, M.A.; & Mendes, A.A. (2016). Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 92, p. 900–909. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.097>
- Basso, A.; & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes - A review. *Molecular Catalysis*, v. 479, p. 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- Bilal, M.; & Iqbal, H.M.N. (2019) Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 130, p. 462–482. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>
- Bolina, I.C.A.; Gomes, R.A.B.; & Mendes, A.A. (2021) Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: current scenario and future perspectives, *BioEnergy Research*, v. 14, p. 1039–1057. <https://doi.org/10.1007/S12155-020-10242-4>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carvalho, W.C.A.; Luiz, J.H.H.; Fernandez-Lafuente, R.; Hirata, D.B.; & Mendes, A.A. (2021). Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking

- oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa<sup>®</sup> Transform 2.0) as heterogeneous catalyst, *Biomass and Bioenergy*, v. 155, p. 106302. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106302>
- Fernandez-Lafuente, R. (2010) Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 197–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>
- Guedes Jr., J.J.E.; Mattos, F.R.; Sabi, G.J.; Carvalho, W.C.A.; Luiz, J.J.H.; Cren, E.C.; Fernandez-Lafuente, R.; Mendes, A.A. (2022). Design of a sustainable process for enzymatic production of ethylene glycol diesters via hydroesterification of used soybean cooking oil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 10, p. 107062. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107062>
- Gutierrez, A.S.A.; Guo, J.; Feng, J.; Tan, L.; & Kong, L. (2020). Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates. *Food Hydrocolloids*, v. 102, p.105603. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105603>
- He, W.S.; Li, J.J.; Pan, X.X.; Zhou, Y.; Jia, C.S.; Zhang, X.M.; & Feng, B. (2012). Lipase-mediated synthesis of water-soluble plant stanol derivatives in tert-butanol. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.093>
- Lage, F.A.P.; Bassi, J.J.; Corradini, M.C.C.; Todero, L.M.; Luiz, J.H.H.; & Mendes, A.A. (2016) Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 84, p. 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.007>
- Lima, L.N.; Mendes, A.A.; Fernandez-Lafuente, R.; Tardioli, P.W.; & Giordano, R.L.C. (2018). Performance of different immobilized lipases in the syntheses of short- and long-chain carboxylic acid esters by esterification reactions in organic media. *Molecules*, v. 23(4), p. 766. <https://doi.org/10.3390/molecules23040766>
- Mendoza-Ortiz, P.A.; Gama, R.S.; Gómez, O.C.; Luiz, J.H.H.; Fernandez-Lafuente, R.; Cren, E.C.; & Mendes, A.A. (2020). Sustainable enzymatic synthesis of a solketal ester – Process optimization and evaluation of its antimicrobial activity. *Catalysts*, v. 10(2), p. 218. <https://doi.org/10.3390/catal10020218>
- Mendoza-Pedroza, J.J.; Sanchez-Ramírez, E.; Segovia-Hernandez, J.G.; Hernandez, S.; & Orjuela, A. (2021). Recovery of alcohol industry wastes: Revaluation of fusel oil through intensified processes. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, v. 169, p. 108329. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108329>
- Miguez, J.P.; Gama, R.S.; Bolina, I.C.A.; Melo, C.C.; Cordeiro, M.R.; Hirata, D.B.; & Mendes, A.A. (2018). Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 139, p. 296–308.
- Monteiro, R.R.C.; Santos, J.C.S.; Alcántara, A.R.; & Fernandez-Lafuente, R. Enzyme-coated microcrystals: An almost forgotten but very simple and elegant immobilization strategy. *Catalysts*, v. 10(8), p. 891. <https://doi.org/10.3390/catal10080891>

- Ngueyn V. H.; Le, M.N.; Ngueyn, H.B.; Ha, K.O.; Pham, T.H.V.; Ngueyn, T.H.; Dao, N.S.H.; Ngueyn, V.G.; Nguyen, D.L.; & Trinh, N.T. (2021). Propyl gallate. *Molbank*, v. 2021(2), p. M1201, 2021. <https://doi.org/10.3390/M1201>
- Ravi, A.; Baskar, G.; Naveenkumar, R.; Sunita, V.; Gnansounou, E.; Pandey, A.; Simming, Y.; Jegannathan, K.R.; & Praveenkumar, R. (2020). Contemporary approaches towards augmentation of distinctive heterogeneous catalyst for sustainable biodiesel production. *Environmental Technology & Innovation*, v. 19, p. 100906. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100906>
- Rios, N.S.; Pinheiro, B.B.; Pinheiro, M.P.; Bezerra, R.M.; Santos, J.C.S.; & Gonçalves, L.R.B. (2018). Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. *Process Biochemistry*, v. 75, p. 99–120. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.003>
- Rodrigues, R.C.; Hernandez, K.; Barbosa, O.; Rueda, N.; Garcia-Galan, C.; Santos, J.C.S.; Berenguer-Murcia, A.; & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Immobilization of proteins in poly-styrene-divinylbenzene matrices: Functional properties and applications. *Current Organic Chemistry*, v. 19, p. 1707–1718. <https://doi.org/10.2174/1385272819666150429231728>
- Rodrigues, R.C.; Virgen-Ortíz, J.J.; Santos, J.C.S.; Berenguer-Murcia, A.; Alcantara, A.R.; Barbosa, O.; Ortiz, C.; & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology Advances*, v. 37, p. 746–770. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>
- Vescovi, V.; Kopp, W.; Guisán, J.M.; Giordano, R.L.C.; Mendes, A.A.; & Tardioli P.W. (2016). Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. *Process Biochemistry*, v. 51 (12), p. 2055–2066. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.016>
- Vescovi, V.; Giordano, R.L.C.; Mendes, A.A.; & Tardioli P.W. (2017). Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. *Molecules*, v. 22(2), p. 212. <https://doi.org/10.3390/molecules22020212>
- Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. *Process Biochemistry*, v. 51 (12), p. 2055–2066. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.016>
- Zhang, G.; Zheng, C.; Huang, B.; & Fei, P. (2020). Preparation of acylated pectin with gallic acid through enzymatic method and their emulsifying properties, antioxidation activities and antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.195>
- Zhong, L.; Feng, Y.; Wang, G.; Wang, Z.; Bilal, M.; Lv, H.; Jia, S.; & Cui, J. (2020). Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 152, p. 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258>

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a realização deste projeto obteve-se a produção de um éster ainda não explorado pela literatura empregando um biocatalisador heterogêneo preparado por imobilização de uma lipase microbiana.

Trabalhos nesta temática é de fundamental importância para o estabelecimento de processos de grande interesse para diferentes segmentos industriais empregando rotas tecnologicamente limpas e também gera a possibilidade de formação de recursos humanos na área de tecnologia enzimática, este estudo mostra que um protocolo apropriado de imobilização da enzima pode melhorar o seu desempenho catalítico e reuso após sucessivas reações de produção de um éster de interesse industrial.

## 5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados deste projeto sugerem estudos adicionais com a finalidade de aumentar a amplitude de aplicação dos produtos, testar condições de melhor desempenho com aplicação de outros tipos de lipases, melhorar a viabilidade econômica e manter o pilar de sustentabilidade, tais como:

Separação e caracterização do produto obtido por diferentes técnicas como análise no infravermelho e ressonância magnética nuclear;

Testes de atividade antioxidante do éster produzido e comparado com o ácido gálico;

Aplicação de lipases de menor custo como biocatalisador, como exemplo a Eversa Tranform 2.0.