

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA SÍLICA MICRO OU
MESOPOROSA E DO ADITIVO LÍQUIDO IÔNICO NA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE APLICADA EM REAÇÕES DE
BIOTRANSFORMAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS**

ARACAJU, SE - BRASIL
FEVEREIRO DE 2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA SÍLICA MICRO OU
MESOPOROSA E DO ADITIVO LÍQUIDO IÔNICO NA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE APLICADA EM REAÇÕES DE
BIOTRANSFORMAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS**

Doutoranda: Nayára Bezerra Carvalho

Orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Cleide Mara Faria Soares.

Prof^º. Dr. Álvaro Silva Lima.


ARACAJU, SE - BRASIL
FEVEREIRO DE 2016

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA SÍLICA MICRO OU MESOPOROSA E DO ADITIVO
LÍQUIDO IÔNICO NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE APLICADA EM REAÇÕES DE
BIOTRANSFORMAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS


Nayára Bezerra Carvalho

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS.

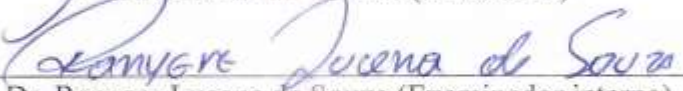
Aprovada por:




Dra. Cleide Mara Faria Soares (Orientadora)




Dr. Alvaro Silva Lima (Orientador)



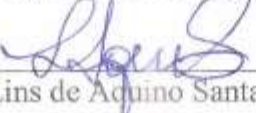
Dr. Ranyere Lucena de Souza (Examinador interno)



Dra. Rebeca Yndira Cabrera Padilla (Examinadora interna)



Dra. Gisella Maria Zanin (Examinadora externa/UEM)



Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana (Examinadora externa/UFS)

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

C331a Carvalho, Nayara Bezerra
Avaliação do potencial da sílica micro ou mesoporosa e do aditivo líquido iônico na imobilização de lipase aplicada em reações de biotransformação de óleos vegetais / Nayára Bezerra Carvalho ; orientação [de] Cleide Mara Faria Soares, Álvaro Silva Lima.-- Aracaju, SE: UNIT, 2016.
144 p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2016.
Inclui bibliografia

1. Engenharia de processos. 2. Imobilizada. 3. Lipase. 4. Biotransformação. I. Soares, Cleide Mara Faria. II. Lima, Álvaro Silva. III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”*

(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, amor e presença em todos os momentos dessa conquista, protegendo-me e renovando a minha fé a cada dia. Aos meus amados pais pelos valores morais, amor incondicional e por todo apoio à minha formação e educação. À minha querida mãe que sempre acreditou no meu sonho e de mão dada comigo percorreu esse caminho me fazendo acreditar, com seu amor, compreensão e paciência, que se tornaria realidade. Ao meu pai que apesar da distância sempre foi tão atencioso e dedicado, me impulsionou, pelo seu amor e exemplo de responsabilidade, a busca pelo meu crescimento profissional e pessoal. À minha única irmã, Taynara, pelo amor, apoio e amizade. Obrigada por tudo e me desculpem pela ausência muitas vezes necessária para a concretização desse sonho.

A Flávio pelo amor, incentivo, companhia nos eventos acadêmicos e principalmente pela paciência e equilíbrio nas horas mais difíceis. A todos os meus familiares, bisavó, avó, tios, tias, primos e primas, por sempre torcerem por mim e pelos momentos de alegria e fraternidade.

Aos meus orientadores Cleide Mara Faria Soares e Álvaro Silva Lima pelos ensinamentos, enriquecimento profissional, dedicação, paciência, amizade, carinho, disponibilidade, orientação em cada etapa deste trabalho, compreensão, incentivo e confiança em me permitir fazer parte do grupo de pesquisa LPA/LEB. Obrigada também ao Prof^o Dr^o Edilson Benvenuti pela recepção e orientação durante o doutoramento sanduiche na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Obrigada especial às gaúchas Andressa, Elisângela e Monique pela recepção, aprendizados e companhia.

À Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa e em especial à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processo. Aos órgãos de fomento (CNPq, Capes e Fapitec) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho. À Universidade de Aveiro, onde por meio do amigo Matheus foram realizadas algumas análises fundamentais para o meu trabalho. Aos professores pelos ensinamentos e disponibilidade. Estendo os meus agradecimentos aos funcionários, professores, doutorandos, mestrandos e estagiários de laboratórios onde também foram realizadas parcerias para o sucesso dessa pesquisa. Aos coordenadores dos cursos de engenharia da Unit do qual faço parte como docente.

O resultado desse estudo só foi possível pela dedicação e pelo esforço de todo o grupo. Cada um de vocês sabe da real importância e reciprocidade. Bruna, Aroni, Jussimara e Gabriela

essa conquista também é de vocês, que foram peças fundamentais desse trabalho dia a dia no laboratório. À Ranyere e Murillo, que juntos iniciamos essa jornada. Aos amigos que estão longe fisicamente Flávia e Emanuelle, mas sempre me apoiaram com palavras de alegria e conforto. Aos amigos do laboratório que irei levar para toda vida: Adriana, Anderson, Isabela, Acenini, Ingrid, Islânia, Jaci, Juliana, Marília, Micael, Poliane, Vanessa. Aos amigos que não fazem parte diretamente desse mundo acadêmico, mas foram também essenciais para que eu estivesse aqui hoje feliz e realizada.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos e forte abraço.

Nayara Bezerra Carvalho

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Processos.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA SÍLICA MICRO OU MESOPOROSA E DO ADITIVO LÍQUIDO IÔNICO NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE APLICADA EM REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS

Nayára Bezerra Carvalho

As estratégias que aprimoram a superfície do suporte para imobilização de enzimas surgem como alternativa para o desenvolvimento e obtenção de um biocatalisador imobilizado com alta eficiência catalítica e sua aplicação em reações de biotransformação. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a aplicação, em reações de hidrólise e transesterificação, da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada em sílica mesoporosa modificada com líquido iônico prótico (pentanoato de N-metilmonoetanolamina) (LI) ou sílica microporosa (Aerosil[®]), imobilizada sobre a lipase na presença do LI. Os biocatalisadores imobilizados foram avaliados quanto à caracterização bioquímica na reação de hidrólise do óleo de azeite de oliva. Os suportes e biocatalisadores foram caracterizados quanto à distribuição de tamanho de partícula, área específica e volume dos poros (método de Brunauer, Emmett e Teller - BET), análise térmica (termogravimetria - TG), composição química (infravermelho com transformada de Fourier – FTIR) e morfologia (microscopia eletrônica de varredura – MEV). Avaliou-se diferentes óleos vegetais (soja, canola e girassol) para a conversão em ésteres etílicos utilizando os biocatalisadores imobilizados por adsorção física. Por meio do planejamento experimental fatorial (2³) cuja as variáveis da reação de transesterificação do óleo de girassol (temperatura, concentração da enzima e razão molar óleo:álcool) foram determinadas: 40°C, 20% m/m, razão molar 1:7 em 96 h. Foi observada uma maior eficiência catalítica do biocatalisador imobilizado por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC) em suporte de sílica modificado com o LI prótico e aplicados na reação de hidrólise e transesterificação. O biocatalisador imobilizado por ADS em sílica modificada com LI apresentou 64% de rendimento de imobilização na reação de hidrólise e a conversão do óleo de girassol em ésteres etílicos foi de 86% em 72 h. Na imobilização da LBC por LC utilizando o agente bifuncional epiclorldrina o rendimento de imobilização foi de 250% e 96% na conversão em ésteres etílicos. Na reação de hidrólise verificou-se as seguintes condições: pH 3,0, 45 °C e a estabilidade operacional para a LBC imobilizada por LC em suporte modificado manteve 40% da sua atividade inicial até o 18° reciclo. Na reação de transesterificação quando utilizada a sílica modificada, para imobilização da lipase pela técnica de adsorção física e ligação covalente o tempo de meia-vida foi 2,8 vezes (571 h) e 2,2 vezes (622 h), respectivamente, maior quando comparada à lipase imobilizada em sílica controle. Ainda avaliou-se uma nova estratégia para a imobilização de sílica microporosa Aerosil[®] sobre a lipase de *Burkholderia cepacia* e observou-se o aumento da estabilidade operacional quando utilizada a técnica de imobilização por ligação covalente na razão mássica (enzima: suporte) de 1:0,2. Porém, o líquido iônico na imobilização do Aerosil[®] sobre a lipase não apresentou efeito positivo significativo. Conclui-se que a modificação da sílica mesoporosa modificada com o aditivo líquido iônico torna-se atrativo para obtenção de suporte e imobilização de biocatalisador com maior rendimento, aplicabilidade e estabilidade operacional e o Aerosil é portanto uma estratégia para imobilização sobre a lipase pela técnica de ligação covalente e melhoria da estabilidade operacional.

Palavras-chave: suporte; sílica; modificação superficial; líquido iônico; imobilização; lipase.

Abstract of Thesis presented to the Process Engineering Post-Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the qualification examination for the achievement of the degree as Doctor of Science (D.Sc.)

AN EVALUATION ON THE POTENTIAL OF MICRO OR MESOPOROUS SILICA AND IONIC LIQUID FOR THE IMMOBILIZATION OF LIPASE APPLIED IN VEGETABLE OILS BIOTRANSFORMATION REACTIONS

Nayara Bezerra Carvalho

Strategies that improve the supporting surface for the immobilization of enzymes emerge as an alternative for the development and obtention of an immobilized biocatalyst with high catalytic efficiency and its application in biotransformation reactions. In this context, the objective of this work was the application in hydrolysis and transesterification reactions of lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC) immobilized in modified mesoporous silica with protic ionic liquid (N-metilmonoetanolamina pentanoate) (IL) or microporous silica (Aerosil®) onto immobilized lipase in the presence of the IL. The immobilized biocatalysts were evaluated for biochemical characterization in the hydrolysis reaction. The supports and biocatalysts were characterized for particle size distribution, surface area and pore volume (Brunauer method, Emmett and Teller - BET), thermal analysis (thermogravimetry - TG), chemical composition (Fourier Transformed Infrared Spectroscopy - FTIR) and morphology (Scanning Electron Microscope - SEM). Different vegetal oils (soy, canol and sunflower) were evaluated for conversion of ethylic esters using immobilized biocatalyst by physical adsorption. Through the factorial experimental design (2^3) which variables of the transesterification of sunflower oil (reaction temperature, enzyme loading and molar ratio of oil: alcohol) were determined: 40 °C, 20% w.w⁻¹, 1:7 in 96 h. A higher catalytic efficiency of the biocatalyst immobilized by physical adsorption (PA) and covalent binding (CB) onto silica support modified with the LI protic and applied in the hydrolysis reaction and transesterification, was seen. The biocatalyst immobilized by PA onto modified silica with LI showed 64% immobilization yield after the hydrolysis reaction and conversion rates higher for ethyl esters of 86% in 72 h. Immobilization of LBC by CB using bifunctional agent epichlorohydrin yielded 250% and 96% conversion to ethyl esters. Hydrolysis reactions presented the following conditions: pH 3.0, 45 °C and the operational stability for LBC immobilized by CB onto modified silica retained 40% of its initial activity up to the 18th recycle. In transesterification reactions when modified silica was used for lipase immobilization by physical adsorption and covalent bonding technique, the half-life was 2.8 times (571 h) and 2.2 times (622 h), respectively, higher compared to lipase immobilized on silica control. A new strategy for the immobilization of microporous silica Aerosil® onto *Burkholderia cepacia* lipase was evaluated and an increase on operational stability when using immobilization technique by covalent attachment in mass ratio (enzyme: support) of 1:0.2, was seen. However, the ionic liquid in the immobilization of Aerosil® on the lipase did not present a representative positive effect. We conclude that modification of the mesoporous silica modified with the ionic liquid additive becomes attractive for support and immobilization of biocatalysts with higher yield, applicability and operational stability and Aerosil becomes a strategy for immobilization of lipase by the technique covalent bond and improved operational stability.

Keywords: support; silica; surface modification; ionic liquid; immobilization; lipase.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
SUMÁRIO	III
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE SIGLAS	XI
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	4
CAPÍTULO II	7
2. OBJETIVOS	7
2.1. OBJETIVO GERAL	7
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	7
INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS III E IV	8
CAPÍTULO III	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
ARTIGO I USO DE SÍLICAS MODIFICADAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
LIPASES E MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	13
SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	20
SÍLICA	25
MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE SÍLICA	28
CONCLUSÃO	35
AGRADECIMENTOS	36
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO IV	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES PARCIAIS	46
ARTIGO II PROTIC IONIC LIQUID: AN ALTERNATIVE ADDITIVE FOR OBTAINING MODIFIED SILICA AND AFTER APPLIED IN LIPASE IMMOBILIZATION BY COVALENT BINDING	46
ABSTRACT	47
INTRODUCTION	48
MATERIALS AND METHODS	49
Materials	49
Silica support preparation by the sol-gel technique	50

<i>Lipase immobilization by covalent binding</i>	50
<i>Enzymatic hydrolysis and transesterification activi</i>	51
<i>Temperature and pH effect on lipase activity in the hydrolysis reaction</i>	53
<i>Operational stability in the hydrolysis reaction</i>	53
<i>Kinetic parameters in the hydrolysis reaction</i>	54
<i>Morphological and physicochemical characterization of silica supports and immobilized systems</i>	54
RESULTS AND DISCUSSION	55
<i>Immobilization Yield</i>	55
<i>Biochemical characterization</i>	57
<i>Temperature and pH effect on lipase activity</i>	57
<i>Determination of kinetic parameters</i>	61
<i>Operational stability of hydrolytic activity</i>	62
<i>Transesterification activity</i>	63
<i>Morphological and physicochemical characterization</i>	67
<i>Scanning electron microscopy (SEM)</i>	67
<i>Specific surface area and porosity</i>	68
<i>Thermogravimetric analysis</i>	70
<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>	71
CONCLUSIONS	73
ACKNOWLEDGEMENTS	73
REFERENCES	73
ARTIGO III STUDIES ON REACTION PARAMETERS INFLUENCE ON SYNTHESIS OF ETHYL ESTERS USING LIPASE FROM BURKHOLDERIA CEPACIA IMMOBILIZED ONTO SILICA MODIFIED WITH IONIC LIQUID PROTIC	79
<i>ABSTRACT</i>	80
<i>1.0. INTRODUCTION</i>	81
<i>2.0. MATERIALS AND METHODS</i>	83
<i>2.1. Enzyme and Chemicals</i>	83
<i>2.2. Preparation of Silica by Sol-Gel Technique</i>	83
<i>2.3. Immobilization by Physical Adsorption (PA)</i>	84
<i>2.4. Immobilization by Covalent Binding (CB)</i>	84
<i>2.5. Enzymatic Activity</i>	84
<i>2.5.1. Hydrolysis Reaction</i>	84
<i>2.5.2. Transesterification Reaction</i>	85
<i>2.5.3. Characterization of Transesterification Products</i>	86
<i>2.6 Reusability of Immobilized Lipase</i>	86
<i>2.7. Morphological and Physicochemical Characterization</i>	87
3.0. RESULTS AND DISCUSSION	88
<i>3.1. Yield Immobilization</i>	88
<i>3.2. Ethyl Ester Conversion</i>	90

3.2.1. Reusability of Immobilized Lipase	96
3.3. Morphological and Physico-Chemical Characterisation of Silica and Immobilized Biocatalyst	98
3.3.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)	98
3.3.2. Specific Surface Area and Porous Propertiesn	99
3.3.3. Thermogravimetric Analysis	102
3.3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy.....	104
4.0. CONCLUSIONS.....	106
ACKNOWLEDGEMENTS	106
SUPPORTING INFORMATION	107
REFERENCES	110
ARTIGO IV A NEW STRATEGY TO MICROPOROUS SILICA IMMOBILIZATION ONTO	
BURKHOLDERIA CEPACIA LIPASE	115
ABSTRACT	116
1.. INTRODUCTION	117
2. MATERIALS AND METHODS	119
2.1. Materials	119
2.2. Physical Adsorption (PA) microporous support (Aerosil®) onto lipase from Burkholderia cepacia	119
2.3. Covalent binding (CB) the microporous support (Aerosil®) onto lipase from Burkholderia cepacia	119
2.4. Operational stability	120
2.5. Determination of the particle surface area, pore volume and diameter	120
2.6. Scanning electron microscopy	120
2.7. Fourier transform infrared spectra (FTIR).....	120
3. Results and discussion	121
3.1. Operational stability of immobilized biocatalysts by physical adsorption (PA) and covalent binding (CB)	121
3.2. Physico-chemical characterization and morphological	124
3.3. Scanning electron microscopy	128
3.4. Fourier transform infrared spectra (FTIR)	130
4.. CONCLUSIONS.....	131
REFERENCES	132
CAPÍTULO V	135
5. CONCLUSÕES	135
CAPÍTULO VI.....	139
6. PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS	139
CAPÍTULO VII	140
7. TRABALHOS PUBLICADOS.....	140

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ARTIGO I

- FIGURA 1.** Ilustração da técnica de adsorção física (a) e ligação covalente (b) para a imobilização de enzimas..... 16
- FIGURA 2.** Sílica com a presença de lipases no interior da rede porosa 18
- FIGURA 3.** Fatores que afetam o desempenho de enzimas imobilizadas em suportes sólidos 20
- FIGURA 4.** Esquema representativo de formação de ponte de hidrogênio entre o Aerosil® (a) e aglomeração para formação da rede tridimensional (b) 24
- FIGURA 5.** Estrutura da sílica e grupamentos presentes 27
- FIGURA 6.** Ativação de suporte de sílica com diferentes grupos bifuncionais o 33

CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO II

- SCHEME 1.** Possible reaction mechanisms of the silica support with functional activating agents glutaraldehyde and lipase..... 51
- SCHEME 2.** Possible mechanism reactions for silica support with functional activating agents epichlorohydrin and lipase..... 51
- FIGURE 1.** Effects on relative activity under various pH and temperature values ranging from pH 2 to pH 10 at 37 °C for lipase from *Burkholderia cepacia* free (LBC) (a), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced with IL (B), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced with IL (C)..... 58
- FIGURE 2.** Effects on relative activity under ranging from 25 to 80 °C for lipase from *Burkholderia cepacia* free (LBC), pH 7.0 (a), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced with IL, pH 3.0 (b), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced without ionic liquid, pH 3.0 (c). 60
- FIGURE 3.** Operational stability of the *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by covalent binding. Reactional conditions were: 45 °C, pH 3, during 10 min and 80 rpm. 63
- FIGURE 4.** Time course of ethyl ester conversion using lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding. Experiments considered under a 40°C, 96 h of reaction and stirring at 80 rpm. Lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding using different oils: soybean (a), sunflower (b) or colza (c). In image (d) a comparison between the three oil types for aliquots taken at 72h of reaction under the already described conditions, is seen.....65
- FIGURE 5.** Scanning electron micrographs of lipase from *Burkholderia cepacia* (a) presenting a spherical form. In (b) it is possible to see control silica support and (c) presenting silica support

produced with protic ionic liquid. The lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto control silica (d) and lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto silica produced with protic ionic liquid (e)..... 68

FIGURE 6. FTIR spectra of the lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC), control silica (SC), silica produced with protic ionic liquid (SIL), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin on silica control (CBE-SC) or lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin on silica produced with protic ionic liquid (CBE-SIL)..... 72

ARTIGO III

FIGURE 1. Pareto chart with 5% level of significance and linear regression coefficient of 0,99: a) PA-MS and b) CB-MS..... 93

FIGURE 2. Response surface for biodiesel conversion due to loading enzyme and temperature by physical adsorption (a) and covalent binding (b) onto modified silica..... 95

FIGURE 3. Scanning electron micrographs of the lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized: PA-SC (a), PA-MS (b), CB-SC (c) and CB-MS (d)..... 99

FIGURE 4. Nitrogen adsorption–desorption isotherms of the mesoporous silica without (SC) and with modified silica (MS) and immobilised biocatalysts by adsorption physical (PA-SC and PA-MS) 100

FIGURE 5. Thermogram of the lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by physical adsorption (a) and covalent binding (b) onto silica control or modified silica 103

FIGURE 6. FTIR spectrum of lipase de *Burkholderia cepacia* free (LBC), SC, MS, PA-SC, PA-MS, CB-SC..... 105

FIGURE 7. Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto silica control by physical adsorption at each 24 h according to the variables shown in Table 10..... 108

FIGURE 8. Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto silica control by physical adsorption at each 24 h according to the variables shown in Table 10..... 108

FIGURE 9. Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto silica control by covalent binding at each 24 h according to the run and variables shown in Table 10..... 109

FIGURE 10. Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto silica control by covalent binding at each 24 h according to the run and variables shown in Table 10..... 109

ARTIGO IV

FIGURE 1. Operational stability silica Aerosil® immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* in the physical adsorption technique at different mass ratios (37°C, pH 7, and 80 rpm 10min)..... 122

FIGURE 2. Operational stability silica Aerosil® immobilized onto lipase from *Burkholderia cepacia* by covalent binding method in different mass ratios (37°C, pH 7, and 80 rpm, 10 min). 123

FIGURE 3. Operational stability silica Aerosil® immobilized onto lipase from *Burkholderia cepacia* in the art by physical adsorption or covalent linkage in the presence of ionic liquid in the weight ratio 1: 0.2 (37 ° C, pH 7, and 80 rpm 10min)..... 123

FIGURE 4. Isotherms of Aerosil® untreated and treated with APTMS and glutaraldehyde 124

FIGURE 5. Method BJH in the pore size distribution of the Aerosil [®] , Aerosil [®] treated and immobilized biocatalyst by covalente binding (CB in different the mass ratio	125
FIGURE 6. Isotherms (a) and diameter distribution (b) of immobilized biocatalysts by covalent binding in different mass ratios.....	127
FIGURE 7. Micrographs of the lipase from Burkholderia cepacia (a), Aerosil [®] (b) Aerosil [®] treated with APTMS (c) Aerosil [®] treated with glutaraldehyde and APTMS (d), Aerosil [®] immobilized onto lipase by physical adsorption without ionic liquid (e), by physical adsorption with ionic liquid (f), by covalent binding without ionic liquid (g) and by covalent binding with ionic liquid (h), by physical adsorption (i) and covalent binding (j) with ionic liquid.	129
FIGURE 8. FTIR spectra of the Aerosil [®] and treated Aerosil [®]	130
FIGURE 9. FTIR spectra of the Aerosil [®] , treated Aerosil [®] , lipase immobilized by physical adsorption with and without ionic liquid, immobilized by covalent binding with and without ionic liquid.....	131

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ARTIGO I

<i>TABELA 1. Breve histórico no desenvolvimento de enzimas imobilizadas</i> ⁵⁴	15
<i>TABELA 2. Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas</i>	23
<i>TABELA 3. Sílica aplicadas na imobilização de lipases</i>	28

CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO II

<i>TABLE 1. Immobilization yield of the two preparations of immobilized lipase onto silica</i>	55
<i>TABLE 2. The Michaelis constant (K_m) and the maximum reaction velocity (V_{max}) of the free enzyme determined by measuring initial rates of the reaction. Where free <i>Burkholderia cepacia</i> (LBC), immobilized by covalent binding without ionic liquid (CBE – SC) and immobilized with ionic liquid (CBE – SIL), are compared</i>	61
<i>TABLE 3. Composition of soybean, sunflower and colza oil fatty acids, comparing fatty acids, carbon chain and their nomenclature</i>	66
<i>TABLE 4. Physicochemical properties of silica supports (SC or SIL) and lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> immobilized by covalent binding onto control silica (CBE-SC) or silica produced with protic ionic liquid (CBE-SIL).</i>	69
<i>TABLE 5. Partial mass loss of lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> (LBC), control silica (SC), silica produced with protic ionic liquid (SIL), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin on control silica (CBE-SC) or lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto silica produced with protic ionic liquid (CBE-SIL)</i>	71

ARTIGO III

<i>TABLE 1. Factor levels used according to the full factorial experimental design, 2³ with three replicates at central levels</i>	85
<i>TABLE 2. Parameters used in the chromatography.</i>	86
<i>TABLE 3. Comparison of yield immobilization of the lipase for the techniques, physical adsorption and covalent bond, in support control or modified</i>	89
<i>TABLE 4. The experimental design factorial design of experiments and the corresponding conversions in the transesterifications reactions</i>	92
<i>TABLE 5. Reusability of lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> immobilized onto SC or MS by physical adsorption or covalent binding in the transesterifications reactions</i>	96
<i>TABLE 6. Half-life of the immobilized biocatalysts</i>	97
<i>TABLE 7. Physico-chemical properties of the silica without (SC) and with ionic liquid (MS) and immobilized biocatalysts</i>	101

TABLE 8. Total mass loss of the lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> , immobilized onto silica support control or modified silica	104
TABLE 9. Main peaks in the FTIR spectrum of LBC, SC, MS, PA-SC, PA-MS, CB-SC and CB-MS samples and tentative assignment according to literature.	105
TABLE 10. The run of experimental design factorial design	107
ARTIGO IV	
TABLE 1. Surface area and pore volume of the silica Aerosil® untreated, treated only with APTMS, treated with glutaraldehyde and APTMS and immobilized biocatalysts by covalent binding in different mass ratios	126
TABLE 2. Surface area and pore volume of the Aerosil® immobilized onto <i>Burkholderia cepacia</i> lipase in the presence or absence of ionic liquid.....	128

LISTA DE SIGLAS

- ADS:** adsorção física
- A_E:** sum of the peak areas corresponding to the esters in the sample
- A_{IS}:** peak area corresponding to the internal standard
- ANVISA:** National Health Surveillance Agency
- APTMS:** 3-aminopropiltrimetoxissilano
- AT:** área total dos picos
- B.E.T:** método de Brunauer-Emmett-Teller
- BF₄:** tetrafluoroborato
- BJH:** Barrett-Joyner-Halenda
- BSA:** albumina de soro bovino
- CALB:** lipase de *Candida antarctica* B
- CB:** covalent binding
- CBE:** covalent binding with epichlorohydrin
- CBG:** covalent binding with glutaraldehyde
- CE:** Concentração enzimática
- C_E:** esteres concentration
- CLEAS:** reticulado do sistema imobilizado por ligação cruzada
- C_{PI}:** internal standard concentration
- CTAB:** brometo de cetiltrimetilamônio
- DTT:** ditioneitol
- EDA:** etilenodiamina
- ENC:** encapsulação
- EPI:** epiclorigrina
- EtAc:** acetato de etila
- EtOH:** etanol
- FID:** detector de ionização de chama
- FTIR:** espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- GLI:** glicidol
- GLU:** glutaraldeído
- GS:** glioxil
- HMPC:** 4-hidroxi-3-metil-2-(2-propenil)-2-ciclopenten-1
- IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry
- IL:** ionic liquid
- K_m:** Michaelis–Menten constant

LBC: lipase de *Burkholderia cepacia* livre
LC: ligação covalente
LI: líquido iônico
LIA: Líquido iônico aprótico
LIP: líquido iônico prótico
MEV: microscopia eletrônica de varredura
MS: mesoporous silica
MS: modified silica
MSP: mesoporosa
MTMS: metiltrimetoxissilano
OS: sílica octil
P/P₀: pressão por pressão crítica
PA: physical adsorption
PEG: polietilenoglicol
PHB: poli-hidróxibutirato
PI: padrão interno
PIL: protic ionic liquids
p-NPP: p-nitrofenil palmitato
POS-PVA: polissiloxano-álcool polivinílico
PVA: álcool polivinílico
PVA-co-PE: poli (álcool vinílico-co-etileno)
RI: rendimento de imobilização
RMN: ressonância magnética nuclear
RSM: response surface methodology
SBA-15: sílica mesoporosa comercial
SC: sílica control
SEM: scanning electron microscopy
SG: grupos glioxila
SGO: suporte hidrofílico-hidrofóbico com grupos octila e glioxila
Si(OH): grupo silanol livre
Si(OH)₂: silanóis associados
SIL: sílica modified with ionic liquid
SiO₂: sílica
SiO₂-PVA: álcool de polivinil-poli-siloxano
Si-O-Si: grupo siloxano
SO: grupos octila
SOG: sílica octil-glioxil

TEOS: tetraetilortosilicato

TFE: 2,2,2-trifluoroetanol

TG: termogravimetric analysis

TGA: análise termogravimétrica

TLL: lipase de *Thermomyces lanuginosus*

TMOS: tetrametoxissilano

U: unidade de atividade enzimática

U_o: unidade de atividade lipolítica oferecidas para imobilização

U_s: unidade de atividade lipolítica presente no suporte imobilizado

v/v: volume de soluto por volume da solução

V_{max}: maximum reaction rate

Ya: yield immobilization

γ-APTS: γ – aminopropiltriétoxissilano

1. INTRODUÇÃO

As lipases são destaque em processos biotecnológicos e a aplicação deste biocatalisador evoluiu expressivamente nos últimos anos com o intuito de atender às exigências ambientais e industriais devido às suas excelentes propriedades funcionais (atividade, seletividade e especificidade) e versatilidade de catalisar processos químicos simples ou complexos sob condições ambientais e experimentais variadas. Estas características despertam o interesse em várias áreas da indústria, química fina, química de alimentos e de análises, destacando-se a produção de ésteres (biodiesel). Contudo, a lipase na sua forma livre possui limitações como solubilidade, instabilidade, inibição por substrato, produtos, solventes e condições extremas (LIESE e HILTERHAUS, 2013; SHELDON e PELT, 2013).

Uma das alternativas para a aplicação de lipase é a utilização da técnica de imobilização de enzima em suportes por adsorção física, ligação covalente ou encapsulação, com o principal objetivo de aumento da eficiência catalítica, minimização dos efeitos difusionais de substratos e produtos, melhoria da estabilidade e capacidade de reciclo (ZHOU e HARTMANN, 2013; ANSARI e HUSAIN, 2012; BRADY e JORDAAN, 2009). Dentre os suportes utilizados para imobilização de enzimas, a sílica (SiO_2) é um dos materiais multifuncionais descritos na literatura com elevado potencial de aplicação devido à sua estabilidade térmica, mecânica e química, propriedades apolares com sítios de adsorção eficientes, fácil preparação e segurança toxicológica (GERARDIN *et al.*, 2013; HARTMANN e KOSTROV, 2013).

A sílica pode ser adquirida comercialmente, como por exemplo, Aerosil[®] ou produzida por meio da técnica sol-gel, podendo ser de origem natural ou sintética. A estrutura da sílica é cristalina ou amorfa, e a porosidade de forma geral pode ser micro, meso ou macroporosa. Na sílica mesoporosa a imobilização da lipase pode ocorrer na sua superfície e/ou poros do suporte, quando microporosa a enzima pode ser imobilizada por meio de aglomeração de enzimas na rede tridimensional e ambos os processos visam à minimização das restrições difusionais e melhoria da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima (LIESE e HILTERHAUS, 2013; ORREGO *et al.*, 2010; BENVENUTTI *et al.*, 2009; ZHURAVLEV, 2000; DEGUSA, 1993).

Com o objetivo de aprimorar os suportes de sílica e suas propriedades para a imobilização de enzimas os mesmos podem sofrer modificações químicas superficiais por meio do emprego de aditivos a partir da introdução de vários grupos funcionais tais como: alquila, amino, carboxila, tiosila, dentre outros (SCHERER *et al.*, 2012; KHARRAT *et al.*, 2011; KAROUT e PIERRE, 2007). Os aditivos além de modificar quimicamente o suporte, melhoram as propriedades físicas e morfológicas dos mesmos, tais como, diâmetro e distribuição dos poros, adiciona grupos funcionais presentes na superfície, e desta forma influenciam diretamente na imobilização e catálise enzimática. Em meio aos aditivos destacam-se o polietilenoglicol, álcool polivinílico, caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos. Pode-se utilizar também como modificadores os agentes silanizadores ou bifuncionais tais como: 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloriglucina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, glicidol, carbonildiimidazol, dentre outros. (JESIONOWSKI *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2013; HARTMANN e KOSTROV, 2013; PAULA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2004).

Dentre os aditivos utilizados na modificação superficial de sílica surge os líquidos iônicos (LIs), que são compostos formados na sua maioria por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico e classificados em apróticos e próticos. Recentemente os líquidos iônicos vem sendo utilizados como aditivos no protocolo de imobilização por encapsulação ou no tratamento do suporte comercial para imobilização de enzima, influenciando na estrutura da sílica, aumentando o tamanho do poro e protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima, e desta forma evitando a desnaturação da enzima pela presença de álcool (ZOU *et al.*, 2014; NAUSHAD *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2012).

Os líquidos iônicos próticos (LIP) possuem um próton de alta mobilidade, são resultantes da combinação de um ácido e uma base de Bronsted e possuem vantagens sobre os líquidos iônicos apróticos como baixo custo e simplicidade de síntese (SOUZA *et al.*, 2013; ALVAREZ *et al.*, 2010). A partir de estudos realizados utilizando LIP na imobilização de lipase em sílica pela técnica de encapsulação observou-se a influência positiva na eficiência catalítica das lipases testadas (BARBOSA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2013). Na literatura são relatados estudos com a modificação da superfície dos suportes comerciais com LI apróticos. Contudo, ainda não se verificou a influência de LIP na superfície do suporte de sílica produzida pela técnica sol-gel para posterior imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* sobre o suporte modificado por adsorção física ou ligação covalente (ZOU *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2012).

Desta forma, verificou-se a necessidade de estudos da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* no suporte modificado com líquido iônico prótico utilizando técnicas tradicionais de imobilização de enzima, por exemplo, adsorção física e ligação covalente. Além da sílica mesoporosa, foi avaliado o uso de sílica microporosa, como por exemplo, o Aerosil[®], considerando as técnicas tradicionais adsorção física e ligação covalente, porém uma nova estratégia de imobilização do Aerosil[®] sobre a lipase foi desenvolvida. As caracterizações (bioquímica, morfológica e físico-química) avaliadas neste estudo permitiram a interpretação dos resultados obtidos para lipase imobilizada, em suportes modificados ou a sílica sobre a lipase, e aplicadas em reações de interesse industrial, hidrólise e transesterificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid Phase Equilibria*, v. 299, p. 42–50, 2010.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 512–523, 2012.
- BARBOSA, A. S.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; INGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F.; Imobilização de lipase por encapsulação em sílica aerogel. *Química Nova*, v. 37, p. 969-976, 2014.
- BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. *Química Nova*, v. 32, p. 1926-1933, 2009.
- BRADY, D.; JORDAAN, E. J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, v. 31, p. 1639-1650, 2009.
- DEGUSA S/A. **Basic characteristics of AEROSIL®**. Technical Bulletins Fine Particles, 1993.
- GERARDIN, C.; REBOUL, J; BONNE, M.; LEBEAU, B. Ecodesign of ordered mesoporous silica materials. *Chemistry Society Review*, v. 42, p. 4217-4255, 2013.
- HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6277-6289, 2013.
- HU, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2291–2299, 2012.
- JESIONOWSKI T.; ZDARTA J.; KRAJEWSKA B.; Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption*, v. 20, p. 801-821, 2014.
- KAROUT, A.; Pierre, A. C. Silica xerogels and aerogels synthesized with ionic liquids. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 353, p. 2900-2909, 2007.

- KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.; CHAABOUNI, M. K. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1083-1089, 2011.
- LIESE, A.; HILTTERHAUS, L.; Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6236-6249, 2013.
- 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*, v. 36, p. 245-251, 2013.
- NAUSHAD, M.; OTHMAN, Z. A. A.L.; KHAN, A. B.; ALI, M.; Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, p. 555-560, 2012.
- OLIVEIRA, M. V. S.; ROS, P. C. M.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as additive. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 36, p. 445-451, 2014.
- ORREGO, C. E.; SALGADO, N.; VALENCIA, J. S.; GIRALDO, G. I.; GIRALDO, O. H.; CARDONA, C. A. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 9–16, 2010.
- PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Interesterification of milkfat with soybean oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilized on SiO₂-PVA on packed bed reactor. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 46, p. 2124-2130, 2011.
- SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v 52, p. 49–57, 2008.
- SCHERER, R. P.; DALLAGO, R. L.; PENNA, F. G.; B, BERTELLA, F.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; PERGHER, SB. B. C. Influence of process parameter son the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 290–294, 2012.

- SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6223-6236, 2013.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS O. A., CASTRO, H. F.; MORAES, F. F. ; ZANIN, G. M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 307-319, 2004.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; Production of ethyl esters and emulsifiers using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase with protic ionic liquid as additives. *Enzyme And Microbial Technology*, v. 52, p. 141-50, 2013.
- YANG, J.; HU, Y.; JIANG, L.; ZOU, B.; JIA, R.; HUANG, H.; Enhancing the catalytic properties of porcine pancreatic lipase by immobilization on SBA-15 modified by functionalized ionic liquid. *Biochemical Engineering Journal*, v. 70, p. 46-54, 2013.
- ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 3894-392, 2013.
- ZHURAVLEV, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 173, p. 1–38, 2000.
- ZOU, B.; SONG, C.; XU, X.; XIA, J.; HUO, S.; CUI, F. Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. *Applied Surface Science*, v. 311, p. 62-67, 2014.

Capítulo II

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como principal objetivo preparar, caracterizar e aplicar, em reações de biotransformação (hidrólise e transesterificação), biocatalisadores imobilizados em sílica utilizando o líquido iônico prótico como aditivo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Modificar a superfície da sílica obtida pela técnica sol-gel utilizando líquido iônico prótico (LIP) e sílica controle (ausência de líquido iônico);
- Averiguar o efeito da modificação superficial do suporte modificado com líquido iônico prótico na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* pelo método de adsorção física e ligação covalente;
- Imobilizar, por adsorção física ou ligação covalente, a sílica microporosa (Aerosil®) na presença de líquido iônico prótico, sobre a superfície da lipase de *Burkholderia cepacia*;
- Caracterizar os suportes e os biocatalisadores imobilizados físico-química e morfologicamente: quanto ao volume de poros, área específica, distribuição do tamanho de poros (Método B.E.T), perda de massa em função da temperatura (TG), composição química (FTIR) e morfologia (MEV);
- Avaliar a eficiência catalítica e caracterizar bioquimicamente os biocatalisadores imobilizados aplicados em reações de hidrólise;
- Avaliar a estabilidade operacional e parâmetros cinéticos dos biocatalisadores imobilizados aplicados em reações de hidrólise;
- Avaliar a eficiência catalítica dos biocatalisadores imobilizados e parâmetros da reação de transesterificação (temperatura, razão molar e carregamento enzimático) utilizando planejamento experimental.

INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS III E IV

Os capítulos III e IV, são apresentados em forma de artigos científicos, e estão organizados conforme as normas propostas pelo periódico de cada publicação. No capítulo III a revisão bibliográfica será apresentada na forma de artigo (Artigo I). O manuscrito intitulado “Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases”, descreve o estado da arte referente aos suportes de sílica modificados superficialmente com aditivos, imobilização de lipases por diferentes técnicas, bem como a aplicação dos biocatalisadores imobilizados em biocatálise, procurando assim evidenciar a relevância do tema em questão para a literatura.

O Artigo I foi publicado pela revista Química Nova (volume 38, número 3, página 399 a 409, 2015, <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140304>), no qual os revisores da revista ressaltaram a atualidade do tema inserido na área de biocatálise, e em especial, no que se refere à aplicação de biocatalisadores imobilizados em diversos setores. Vale ressaltar que o trabalho foi avaliado dentro das normas do periódico, no qual artigos de revisão são destinados à apresentação do progresso em uma área específica, contendo uma visão crítica com o objetivo principal de beneficiar a comunidade formada por pós-graduandos e especialistas da área. Portanto, o artigo é considerado uma importante fonte de informação dos avanços na área de biotransformação usando lipases imobilizadas em suportes modificados superficialmente.

No Capítulo IV, Resultados e Discussão, serão apresentados e discutidos os resultados utilizando-se três artigos científicos (Artigo II, III e IV) com base nos objetivos propostos deste estudo e normas de cada periódico selecionado para a publicação. O artigo constitui-se do resumo, da introdução, dos materiais e métodos específicos de cada trabalho, dos resultados obtidos e discussão, além das conclusões.

No Artigo II, intitulado “Protic ionic liquid: an alternative additive for obtaining modified silica and after applied in lipase immobilization by covalent binding”, a lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada por ligação covalente em sílica mesoporosa modificada superficialmente com um líquido iônico prótico, pentanoato de N-metilmonoetanolamina utilizando dois agentes bifuncionais: glutaraldeído ou epiclorigrina. O biocatalisador que apresentou maior rendimento de imobilização foi caracterizado bioquimicamente quanto ao pH e temperatura ótima, parâmetros cinéticos, e estabilidade operacional na reação de hidrólise. Além disso, foi avaliado o potencial catalítico na reação de transesterificação de três diferentes óleos vegetais: óleos de girassol, de soja e de canola. O suporte de sílica modificado e os

biocatalisadores imobilizados foram caracterizados pelo método de MEV, BET, TG e FTIR. O artigo foi submetido ao periódico Energy & Fuels.

O terceiro artigo (Artigo III) desta tese (“Studies on reaction parameters influence on synthesis of ethyl esters using lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized onto silica modified with ionic liquid protic”) verificou a influência do líquido iônico no suporte de sílica e sua aplicação para imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) pela técnica de adsorção física e ligação covalente. Os biocatalisadores imobilizados foram aplicados em reações de transesterificação do óleo de girassol para produção de ésteres etílicos. Os parâmetros reacionais analisados foram temperatura (40, 50 e 60°C), carregamento enzimático (10, 15 and 20% m.m⁻¹) e razão molar óleo:etanol (1: 7, 1:10 e 1:13) utilizando o planejamento fatorial 2³ com três pontos centrais. A caracterização físico-química dos suportes e biocatalisadores imobilizados foi realizada pelos métodos de MEV, TGA, BET e FTIR. O artigo será submetido ao periódico International Journal of Molecular Science.

A partir dos resultados obtidos durante o doutoramento sanduíche na Universidade Federal do Rio Grande do Sul apresenta-se o quarto artigo (Artigo IV) desta tese, no qual o objetivo foi imobilizar o suporte de sílica microporoso (Aerosil®) sobre a lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica de adsorção física ou ligação covalente (glutaraldeído) na ausência ou presença do líquido iônico prótico, avaliar a estabilidade operacional na reação de hidrólise do azeite de oliva, determinar a área específica da partícula, diâmetro e volume dos poros pelo método BET. e BJH, analisar os suportes e biocatalisadores por meio das técnicas de MEV e FTIR para posterior submissão ao periódico Adsorption.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ARTIGO I

Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases

Nayara B. Carvalho, Álvaro S. Lima e Cleide M. F. Soares*

Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, 49032-490 Aracaju – SE, Brasil

Química Nova, Vol. 38, No. 3, 399-409, 2015

<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140304>

Enzyme-support strategies are increasingly replacing conventional chemical methods in both laboratories and industries with attributes including efficiency, higher performance and multifarious use, where silica surfaces show potential due to the chemical bonds based on the presence of hydroxyl groups which can be modified with different additives. Surface-modified silica is a novel class of materials capable of improving enzyme stability and reusability that can be applied to support several immobilization techniques. This review describes the use of innovative modified supports to improve the state of enzyme immobilization and provide the industrial sector with new perspectives.

Keywords: silica; surface modification; lipase immobilization.

INTRODUÇÃO

Os suportes aplicados para imobilização de enzimas têm merecido atenção em vários estudos de biocatálise, destacando aqueles que tratam dos suportes de sílica e de suas modificações superficiais. Os protocolos metodológicos baseiam-se na utilização de aditivos ou agentes bifuncionais e têm como intuito aprimorar os suportes para a obtenção de biocatalisadores imobilizados.¹⁻³

As modificações físicas, químicas e morfológicas dos suportes, pela aplicação de aditivos, podem produzir biocatalisadores imobilizados com maior eficiência catalítica devido à minimização dos efeitos difusionais de substratos e produtos durante a reação, além da melhoria da estabilidade operacional em processos contínuos e descontínuos, e por esta razão desperta também o interesse industrial para estes biocatalisadores.^{4,5}

Em suportes de sílica, as modificações superficiais podem ocorrer com introdução de vários grupos funcionais tais como: alquila, amino, carboxila, tiosila, dentre outros, e tem como objetivo tornar o suporte mais eficiente ao processo de imobilização de enzimas e catálise.⁶⁻⁸ Estes grupos funcionais podem ser adicionados ao suporte antes da imobilização com a utilização de diferentes aditivos como polietilenoglicol - PEG, álcool polivinílico - PVA, caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos.^{2,9-12} Pode-se utilizar também como modificadores os agentes silanizadores e bifuncionais, tais como 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltriethoxissilano, 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloriglicol, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, glicidol, carbonildiimidazol, dentre outros.¹³⁻¹⁶

Os suportes naturais e sintéticos podem ser classificados como orgânico, inorgânico ou híbridos, não poroso, microporoso, mesoporoso ou macroporoso.^{13,17} Do ponto de vista geral, o método de classificação do suporte não altera o sistema imobilizado obtido, uma vez que as técnicas de imobilização envolvem uma combinação de métodos básicos de ligação física e química.^{4,18,19}

A enzima lipolítica, quando imobilizada, é especialmente atraente em processos biotecnológicos com o intuito de atender as exigências para aplicação industrial, como por exemplo, reações de biotransformação. A melhoria da eficiência catalítica ocasiona o aumento do valor agregado frente aos princípios da química verde e sustentabilidade.²⁰ Portanto, este

artigo de revisão destina-se à apresentação de estudos em desenvolvimento quanto à modificação superficial de suportes para imobilização de lipases.

LIPASES E MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Estudos recentes descrevem o amplo espectro catalítico que promove sua versatilidade nas diversas reações. Segundo Kapoor e Gupta,²⁰ a versatilidade das lipases, relatado em seu manuscrito como promiscuidade, é a capacidade das enzimas catalisarem diferentes reações na sua fisiológica natural, podendo ocorrer em diferentes áreas: versatilidade da condição enzimática (catálise em condições não naturais, como meio anidro, diferentes temperatura ou pH); versatilidade da enzima e substrato (catalisam grande intervalo de substratos devido a sua ampla especificidade) e, por fim, a versatilidade catalítica (capacidade do sítio ativo em catalisar transformações quimicamente distintas).

Do ponto de vista industrial as lipases são consideradas muito importantes devido às suas propriedades catalíticas e fácil produção em escala ampliada.²¹⁻²⁷ As lipases podem ser produzidas por diversos micro-organismos, como *Bacillus* sp., *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor*, *Geotrichum* sp., *Tulopsis* sp. e *Candida* sp..^{2,9,25,28-33}

As lipases são aplicadas em diversas indústrias devido à sua capacidade de hidrolisar triglicerídeos na interface óleo-água que, sob condições fisiológicas, catalisam a hidrólise das ligações de éster nas moléculas de triglicerídeos liberando gratuitamente ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Além da hidrólise, as lipases também catalisam reações como: esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação.³⁴⁻³⁸

As lipases produzidas pelo gênero *Pseudomonas* (renomeada também como *Burkholderia cepacia*) possuem características de biocatálise especiais, como termoestabilidade e enantiosseletividade. Por exemplo, cepas de *Burkholderia cepacia* possuem em seu sítio ativo a presença de tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos da serina, histidina e aspartato e destacam-se por serem utilizadas na produção industrial de lipases empregadas em síntese de compostos quirais e ésteres.³⁹⁻⁴⁵

De acordo com a crescente aplicação de lipases e o interesse na melhoria catalítica os estudos são desenvolvidos e, ao longo do tempo, resulta em uma evolução expressiva na publicação de artigos e patentes na área de biocatálise, contribuindo para a competitividade em termos de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico e aplicações industriais.^{20,27,46,47}

Apesar de muitas vantagens, as enzimas apresentam desvantagens quanto à estabilidade operacional e de armazenamento, pois são moléculas complexas, altamente sensíveis e com estruturas tridimensionais únicas que são essenciais para suas atividades. Sua exposição a determinadas condições (específicas para cada tipo de enzima) tais como temperaturas extremas ou solventes orgânicos, pode conduzir à desnaturação (desdobramentos) e à perda concomitante de atividade e impossibilidade de recuperação e reutilização deste biocatalisador. Portanto, apesar da nova expressão utilizada para lipase, denominada “enzima versátil”, o uso desta enzima exerce um potencial de aplicação para expandir no que diz respeito aos processos de química verde e sustentável, promovendo assim o aumento da sua estabilidade e possibilidade de reutilização ou utilização em processos contínuos.⁴⁸⁻⁵¹

Os fenômenos físico-químicos, tais como partição, solvatação e difusão, afetam significativamente a eficácia do biocatalisador em cada sistema específico na reação.⁵² Conforme Liese e Hilterhaus,⁵³ a maior estabilização é obtida por meio da imobilização da enzima em suportes heterogêneos, os quais estão diretamente relacionados à sua atividade, fenômenos de transporte de massa e limitações para aplicações industriais. Para uma avaliação criteriosa do processo a ser escolhido deve-se levar em consideração a escolha do suporte, o efeito limitante difusional, rendimento de imobilização e análise superficial dos biocatalisadores imobilizados.

Desde da década de 70 existem relatos na literatura sobre a imobilização de enzimas e, em 1971, essa técnica foi definida pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática como “enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente”. É possível destacar três etapas no desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados (Tabela 1).^{31,52,53}

Tabela 1. Breve histórico no desenvolvimento de enzimas imobilizadas⁵⁴

Épocas	Data	Utilização
1 ^a	1815	Empírica utilização em processos tais como produção de vinagre e o tratamento de águas residuais.
2 ^a	1960	Imobilização de enzimas para a produção de L aminoácidos e isomerização de glicose.
3 ^a	1985–1995	Imobilização de múltiplas enzimas, incluindo o co-fator de regeneração e imobilização de células; produção de L-aminoácidos em reatores de membrana.

A enzima pode ser ligada ao suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz e a classificação do método de imobilização pode ser considerada quanto ao tipo de interação responsável pela ligação da enzima no suporte, como meios químicos ou físicos, ou a natureza do suporte: poroso ou não-poroso.⁵⁵⁻⁵⁷

Segundo Sheldon e Pelt,⁴ os métodos para a imobilização são divididos em três categorias: adsorção num suporte, ligação covalente em um suporte e encapsulamento. Estas são combinações de métodos químicos que envolvem a formação de, no mínimo, uma ligação covalente entre os resíduos terminais de uma enzima e um grupo funcional do suporte, ou entre duas ou mais moléculas de enzima; métodos físicos que envolvem as forças físicas como adsorção, interações eletrostáticas; métodos de encapsulação ou microencapsulação em matrizes poliméricas.^{17,58-60}

A adsorção física (ADS) é um dos métodos mais simples para imobilizar enzimas e não altera facilmente o seu sítio ativo. As forças físicas envolvem apenas as interações fracas, tais como ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e ligação de van der Waals. Na adsorção iônica a imobilização baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido que contém íons residuais, resultando no potencial zeta do sistema (medida da carga eletronegativa que circundam as micropartículas). Segundo a literatura, as cargas presentes nas paredes porosas do suporte e cargas da enzima podem ser variadas para fornecer condição ideal de imobilização.⁶¹

A interação por adsorção física (Figura 1a) é fraca e pode ocasionar a lixiviação da enzima nos meios reacionais, por isso se faz necessário estudos quanto à influencia da porosidade do suporte neste método.^{1,48} A facilidade de dessorção leva a uma fácil perda enzimática, mas isso

pode ser também visto como uma vantagem, pois permite a recuperação do suporte após desnaturação da enzima e nova imobilização. Este método apresenta-se como o mais empregado no setor industrial, que utiliza lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos.⁶²⁻⁶⁵

Kharrat *et al.*⁶⁶ imobilizaram a lipase de *Rhizopus oryzae* por adsorção física em aerogéis de sílica (secagem em meios pressurizados) e observaram que as propriedades funcionais da lipase imobilizada foram estáveis em temperaturas e valores de pH extremos e solventes apolares, apresentando também a manutenção da atividade após 4 meses de armazenamento à 4 °C. Este biocatalisador imobilizado foi aplicado na esterificação de ácido oleico com n-butanol, usando hexano como solvente orgânico. O melhor rendimento de conversão do éster de oleato de butila foi obtido com a lipase imobilizada (80% versus 35% com a lipase livre) e 12 ciclos de reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica.

Devido à facilidade de imobilização pelo método de adsorção física e grande utilização destes biocatalisadores imobilizados, é possível adquiri-los comercialmente imobilizados em suportes, como, por exemplo, a lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em resina poliacrílica, (Novozym[®] 435) manufaturada pela Novozymes.^{67,68} Outra lipase imobilizada também bastante utilizada em biotransformação é a lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), comercializada pela Novozymes.^{29,69}

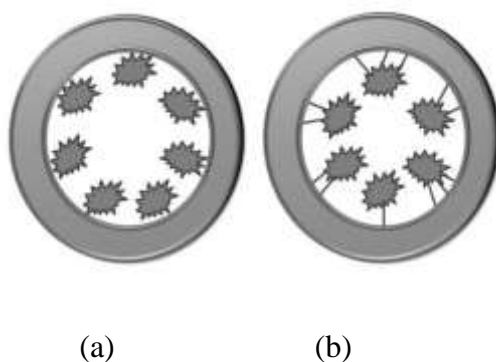


Figura 1. Ilustração da técnica de adsorção física (a) e ligação covalente (b) para a imobilização de enzimas

A ligação covalente (LC), ilustrada na Figura 1b, é uma técnica de imobilização de enzimas que envolve a modificação na superfície do suporte com agentes bifuncionais para imobilização eficiente e irreversível da enzima. Portanto, é considerada uma alternativa à fraca ligação proporcionada pelos métodos de adsorção física, no entanto, por envolver tratamento químico do suporte, pode ocorrer modificação no sítio ativo da enzima.^{1,18,70,71}

No caso específico das lipases uma interface água-solvente é exigida para sua total atividade catalítica, o uso de agentes macromoleculares mostram efeitos estabilizantes significativos na atividade da enzima por meio do revestimento da interface, impedindo a alteração da estrutura proteica.³⁸ Partindo do pressuposto de que uma das principais vantagens da imobilização de enzimas é a reutilização do biocatalisador, a lixiviação deve ser evitada e, atualmente, estudos são realizados para evitar perda das enzimas imobilizadas principalmente em materiais mesoporosos (MSP).

A reticulação de moléculas de enzima dentro dos nanocanais com agentes bifuncionais também é realizada com o objetivo de fechamento parcial das aberturas dos poros com enzimas pré-carregadas e deposição de camadas de polieletrólitos para cobrir as aberturas dos poros. Nestes processos descritos por Lee *et al.*,⁶¹ observou-se a reticulação de moléculas de enzima dentro dos nanocanais com glutaraldeído, a redução parcial das aberturas dos poros sobre a superfície externa por sinalização das enzimas pré-carregadas e a deposição de polieletrólitos na superfície do lado de fora do poro para cobrir os canais de abertura.

Um tipo especial de imobilização por ligação covalente é a imobilização por ligações cruzadas. Nesse método as enzimas são fortemente ligadas entre si, com a utilização de um agente multifuncional. É primordial nesta técnica de imobilização a seleção de um reagente que promova a ligação entre grupos não envolvidos na catálise e que esteja em concentração suficiente para a completa imobilização e manutenção da atividade enzimática.^{51,52,59} De acordo com Sheldon⁵⁰ os biocatalisadores imobilizados por esta técnica apresentam geralmente uma melhor estabilidade de armazenamento e operacional, protegendo da desnaturação pelo calor, por solventes orgânicos, e lixiviação durante a reação. Além disso, eles têm elevada produtividade (produto kg por quilograma biocatalisador), facilidade de recuperação e reciclo. Ainda pode-se salientar a possibilidade de co-imobilizar dois ou mais tipos de enzimas formando o agregado enzimático por ligações cruzadas, definido na literatura por CLEA (cross-linked enzyme aggregates, em inglês), que são capazes de catalisar múltiplas biotransformações, em passo único ou em sequência de uma série de processos catalíticos.

Na encapsulação o método baseia-se em envolver a enzima em meio semipermeável reticulado ou microcápsula. Os meios poliméricos reticulados devem ter poros pequenos o suficiente para não permitir a passagem das enzimas, mas oferecendo passagem livre aos substratos e produtos. Isso permite que as enzimas permaneçam na solução, mas que fiquem protegidas de efeitos externos. Apesar da vantagem de não ocorrência de alteração estrutural da enzima, esse método pode não ser aplicável em alguns casos, por exemplo, se o substrato da enzima for grande e não passar pelos poros do suporte.^{10,12,52}

A encapsulação de enzimas pela técnica sol-gel é resultante de dois processos simultâneos: condensação dos precursores de sílica para formação da rede porosa de sílica e a encapsulação aleatória da enzima (Figura 2).^{11,33,72,73}

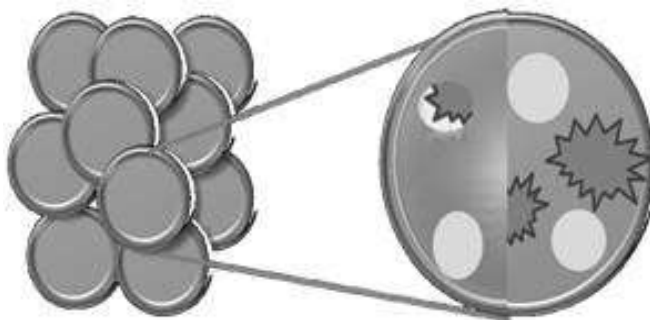


Figura 2. *Sílica com a presença da lipase no interior da rede porosa*

O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais do sistema, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto. Além disso, aditivos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico. Recentemente matrizes híbridas foram testadas com sucesso para imobilização de diferentes lipases: lipase de *Candida rugosa*, lipase de *Burkholderia cepacia*, lipase de pâncreas suíno e lipase de *Bacillus* sp.^{9,10,11,33,74}

Pinheiro *et al.*³³ estudaram diferentes tempos de gelificação (4, 18, 24 e 48 horas) da matriz produzida pela técnica sol-gel utilizando tetraetoxissilano como precursor para encapsulação

da lipase de *Candida rugosa*. Este estudo mostra que o tempo de gelificação está ligado diretamente com a formação química do biocatalisador imobilizado e, conseqüentemente, afeta o volume total de poros. O tempo de 24 h na etapa de gelificação e evaporação da estrutura monolítica da matriz foi selecionado devido a melhor combinação da estabilidade térmica e percentagem de hidrólise (99,5%).

O método sol-gel também foi utilizado para encapsulação da lipase de *Rhizomucor miehei* por Macario *et al.*⁷⁵ Para a formação da matriz mesoporosa foi utilizado um processo que envolve a hidrólise/policondensação de um precursor de sílica a um pH neutro e temperatura ambiente. O biocatalisador encapsulado foi utilizado na reação de transesterificação de trioléina com metanol na ausência de solvente, alcançando maior rendimento de 77% de ésteres após 96 h a 40 °C. Constatou-se que a produtividade total da enzima imobilizada foi quase seis vezes maior do que a obtida usando lipase livre. Os resultados indicaram claramente que o processo de imobilização da lipase preserva a mobilidade da enzima e permite aumentar a sua estabilidade.

No estudo realizado por Carvalho *et al.*,¹⁰ a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 encapsulada pela técnica sol-gel, utilizando o tetraetilortosilicato como precursor, foi caracterizada bioquimicamente na reação de hidrólise do azeite de oliva e foi possível verificar a melhoria dos parâmetros cinéticos quando comparada com a enzima na sua forma livre. Souza *et al.*⁹ adicionaram diferentes líquidos iônicos durante o encapsulamento pela mesma técnica sol gel, utilizada por Carvalho *et al.*,¹⁰ para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*. Os resultados foram comparados ao biocatalisador imobilizado na ausência do aditivo líquido iônico e, quando na presença do aditivo, houve aumento de área de superfície (143 a 245 m²/g) e diâmetro dos poros (19 a 38 Å). Observou-se também maior rendimento de imobilização, possivelmente devido à proteção promovida pelo líquido iônico durante a encapsulação, impedindo a inativação da lipase ocasionada pelo álcool e encolhimento de gel durante o processo sol-gel.

Embora cada método de imobilização apresente vantagens e desvantagens, a escolha da estratégia e de modificação do suporte deverá considerar as relações entre suporte, enzima e substrato, parâmetros físicos (por exemplo, temperatura e pressão), solvente (solvente orgânico, o líquido iônico, fluido supercrítico, etc), água para a manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional das lipases e o tipo de reator (reator de tanque agitado, reator de membrana, reator de leito fixo, reator de coluna de bolhas).^{17,57,76}

SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

O recente interesse em nanotecnologia tem proporcionado uma diversidade de materiais que podem suportar enzimas imobilizadas devido às suas potenciais aplicações em biotecnologia. Contudo, além do desenvolvimento de novas técnicas, faz-se necessário desenvolvimento adequado de técnicas de aprimoramento de materiais que combinem desempenho tecnológico com renovação e sustentabilidade econômica.¹⁷ A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada em um suporte irá depender da não solubilidade do suporte, superfície de contato, porosidade e fixação irreversível, sem afetar a atividade enzimática e sem interferir na reação na qual esteja sendo aplicada. Portanto, a interação entre o suporte e a enzima irá fornecer ao biocatalisador imobilizado as suas propriedades bioquímicas, mecânicas e cinéticas (Figura 3).^{1,77,78}

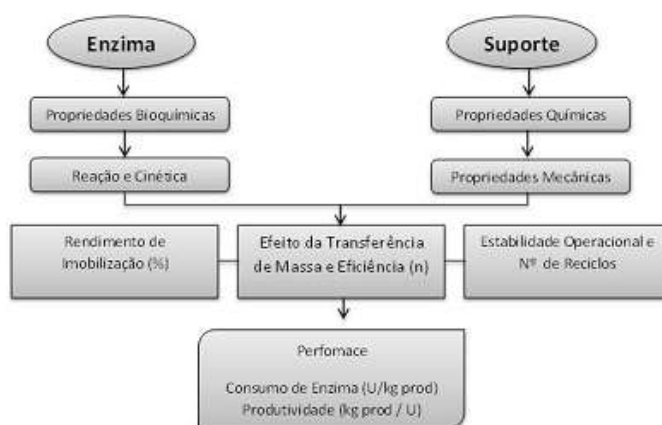


Figura 3. Fatores que afetam o desempenho de enzimas imobilizadas em suportes sólidos

Neste intuito, é necessário o aprimoramento de suportes, por exemplo, por meio de modificações de sua morfologia com aditivos e/ou estabilizantes para aplicação destes na imobilização de enzimas, assegurando a estabilidade e reutilização da enzima e, conseqüentemente, melhorando a relação custo-benefício do processo. Portanto, se o suporte for criteriosamente selecionado pode-se também aumentar o tempo de meia-vida, isto é, a estabilidade operacional. Contudo, caso essa estratégia seja feita de forma inadequada poderá afetar adversamente a estabilidade e o desempenho global do sistema imobilizado.^{66,79,80}

De acordo com Cantone *et al.*,⁵² a seleção de um suporte para imobilização de enzimas deve analisar as características físicas, químicas e morfológicas, bem como a possibilidade de

regeneração do material e sua influência quanto à enzima imobilizada. Estas características irão determinar o a aplicabilidade do biocatalisador. Bon *et al.*³¹ relataram que as principais características a serem observadas na seleção de um suporte que, possivelmente, afetam o desempenho do biocatalisador imobilizado são:

- Características químicas: as quais são baseadas na composição química, grupos funcionais, estabilidade química, composição da superfície do suporte e micros efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos);
- Características mecânicas: referem-se ao comportamento de compressão, tamanho da partícula, diâmetro do poro, área superficial, volume acessível da matriz, resistência à compactação em operações com altas vazões para reatores de leito fixo, abrasão para reatores agitados e velocidade de sedimentação para leitos fluidizados;
- Características morfológicas: associadas à porosidade do suporte, podendo ser não porosos (baixa área superficial), porosos (grande área superficial) ou estrutura em gel.

Dentre as características citadas acima, a estabilidade mecânica do suporte também é um parâmetro crucial para muitas aplicações de enzimas imobilizadas. A estabilidade mecânica pode limitar o biocatalisador imobilizado ao longo da aplicação, causando o efeito de stress mecânico e desintegração do catalisador durante o processo, influenciando a atividade catalítica, estabilidade de armazenamento, operacional e térmica.⁵³

De acordo com Talbert e Goddard *et al.*,¹⁸ o material utilizado como suporte para a imobilização de enzimas pode modificar a quantidade de água total nas proximidades da enzima e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura reacional. Portanto, o balanço hidrofílico/hidrofóbico da superfície do suporte é fundamental, pois na etapa de preparação de suportes hidrofóbicos a água pode ficar retida nos interstícios porosos e, conseqüentemente, ao redor da enzima imobilizada. A presença da quantidade mínima de moléculas de água no microambiente é necessária para preservação da estrutura conformacional da enzima. Todavia, o uso de suportes hidrofílicos no processo de imobilização promove a competição da água entre o suporte e a enzima durante a reação, influenciando no equilíbrio termodinâmico do sistema.⁵²

A natureza física do suporte, por exemplo, morfologia, tamanho e distribuição dos poros, influencia também diretamente no rendimento de imobilização e em efeitos difusionais causados pela transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores imobilizados.

Essas limitações podem ser resumidas em duas fases: transferência de massa externa, que envolve a transferência de reagentes/substratos do meio reacional até a superfície do suporte de imobilização, e a transferência de massa interna, que descreve a transferência de reagentes/substratos no suporte de imobilização até o sítio ativo da enzima. Qualquer etapa da difusão pode limitar a atividade global da enzima imobilizada.^{5,53,70,81}

Ainda se deve considerar o custo-benefício da escolha do suporte de imobilização, pois de acordo com Scherer *et al.*,⁷⁹ o preço do suporte utilizado na imobilização de enzimas é um fator a ser analisado, devendo ser comparadas as vantagens e desvantagens da aplicação dos biocatalisadores nos diferentes processos.

Conforme a classificação dos suportes quanto à composição, os materiais mais utilizados são os orgânicos, notadamente os polímeros, os quais podem ser naturais ou sintéticos. Os suportes sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas, podendo ser combinadas para formar um suporte ideal. Os naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, como baixo custo e facilidade de degradação, sem causar danos ao meio ambiente.^{31,62}

Contudo, os suportes inorgânicos, naturais ou sintéticos, são mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, estabilidade em ampla faixa de pressões, temperaturas e valores de pH, rigidez, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano.^{1,5,31} Na Tabela 2 são apresentados diferentes suportes para imobilização de lipases e sua classificação.

Tabela 2. Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas

Natureza	Classificação do suporte	Suporte	Lipase	Referência
Natural	Orgânico	Bagaço da cana-de-açúcar	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Mendes <i>et al.</i> ¹³
		Quitosana	<i>Talaromyces thermophilus</i>	Romdhane <i>et al.</i> ⁸²
		Fibra de coco	<i>Candida antarica B</i>	Brígida <i>et al.</i> ⁸³
	Inorgânico	Nanofibra	<i>Candida rugosa</i>	Zhu e Sun ¹⁹
		Argila	Pâncreas suíno	Scherer <i>et al.</i> ⁷⁹
		Sílica	<i>Rhizopus oryzae</i>	Kharrat <i>et al.</i> ⁶⁶
Sintético	Orgânico	Poliuretano	<i>Rhizopus oryzae</i>	Grosso <i>et al.</i> ⁸⁴
		Poliestireno	Pâncreas suíno	Hou <i>et al.</i> ⁸⁵
		PHBV	<i>Bacillus sp.</i> ITP-001	Cabrera-Padilla <i>et al.</i> ⁸⁶
	Inorgânicos e Orgânicos	Polipropileno	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Salis <i>et al.</i> ⁸⁷
		Eupergit C	<i>Rhizopus oryzae</i>	Nunes <i>et al.</i> ⁸⁸
		POS-PVA	<i>Rhizopus oryzae</i>	Paula <i>et al.</i> ⁸⁹
		Sílica	<i>Bacillus sp.</i> ITP-001	Carvalho <i>et al.</i> ¹⁰
Inorgânico	Nanopartícula de Fe ₃ O ₄	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Andrade <i>et al.</i> ⁹⁰	
	Alumina	<i>Bacillus sp.</i>	Kumar <i>et al.</i> ⁹¹	

PHBV = Poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato); POS-PVA = Tetra-etilortossilicato-álcool polivinílico.

Independente da natureza do suporte, a classificação pode ser realizada levando em consideração também a sua morfologia e porosidade, apresentando-se como fator importante devido à possibilidade de imobilização da enzima na sua superfície e/ou no seu interior, sem afetar a estabilidade estrutural da enzima.^{18,78,92}

Segundo a IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry), os materiais porosos são classificados em função do diâmetro como microporoso, mesoporoso ou macroporoso. Suportes microporosos (diâmetro menor que 2 nm) apresentam como vantagem a eliminação da resistência à transferência de massa interna, e podem ser úteis no processo de imobilização de enzimas devido à formação de uma rede ou agregados. Na Figura 4 é possível verificar partículas microporosas isoladas e combinadas.

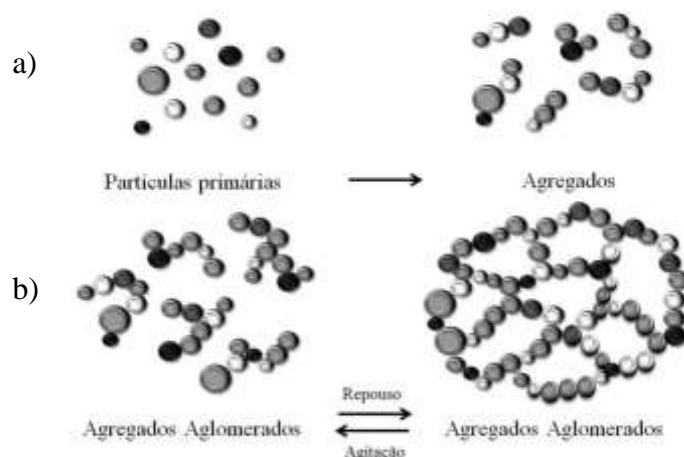


Figura 4. Esquema representativo de formação de ponte de hidrogênio entre o Aerosil® (a) e aglomeração para formação da rede tridimensional (b)

As partículas isoladas, quando ligadas por ligações de hidrogênio, originam aglomerados estáveis que podem ter centenas de nanômetros de tamanho e, deste modo, formar uma rede tridimensional.^{93,94} A eficiência da imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suporte microporoso hidrofóbico, poli(estireno-divinilbenzeno), relatada por Dizge *et al.*,⁹⁵ mostrou que o biocatalisador imobilizado aplicado na reação de transesterificação possui 85% de rendimento de imobilização e estabilidade operacional durante 15 ciclos.

Grandes áreas superficiais são características de suportes mesoporosos (diâmetros que variam de 2 a 50 nm), tornando-se uma estratégia geralmente positiva devido à minimização das restrições difusionais e melhoria da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima.³¹ Nos últimos anos vários artigos indicam o progresso no uso de materiais mesoporosos e suas contribuições correspondentes ao processo de imobilização de enzima, bem como as aplicações na biocatálise: sílica amorfa, organosílica, carbono mesoporoso, zeólitas, dentre outros. Aditivos têm sido introduzidos com o objetivo de melhorar a formação dos mesoporos durante a obtenção do suporte e diversos estudos apontam as tendências em potencial desenvolvimento deste campo.^{1,9,10,77}

As partículas que apresentam diâmetros maiores que 50 nm são denominadas suportes macroporosos e são formadas por densas camadas de grupos altamente hidrofóbicos. Alguns exemplos destes suportes são: copolímero de estireno-divinilbenzeno, polipropileno poroso

Accurel, resina acrílica macroporosa e alumina, os quais também são empregados como suportes para imobilização de lipases.^{96,97} O uso de suportes macroporosos para imobilização de enzimas é pouco relatado na literatura e relacionado com a possibilidade de lixiviação da enzima do poro do suporte durante a utilização do biocatalisador imobilizado. Portanto, sugere-se o uso de suportes micro ou mesoporosos.^{5,77}

SÍLICA

A sílica (SiO_2) é um dos materiais multifuncionais descritos na literatura com elevado potencial de aplicação para imobilização, principalmente devido à possibilidade de modificação da superfície deste suporte, atendendo assim a classificação da IUPAC, estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica.^{11,28,98,99} As características físico-químicas e morfológicas da sílica podem ser descritas como natural ou sintética, micro, meso ou macroporosa, cristalina ou amorfa e com propriedades polares, as quais são consideradas sítios de adsorção eficientes para imobilização da enzima, promovendo estabilidade química e térmica ao biocatalisador imobilizado.^{99,100,101}

A sílica pode ser adquirida comercialmente ou também ser produzida por diferentes técnicas, sendo que dentre elas a mais utilizada para imobilização de enzimas é a sílica produzida pela técnica sol-gel.^{5,6,11,28}

O Aerosil[®] é uma sílica comercial pirogênica com elevada pureza, amorfa e de finíssima granulometria vendida pela Degusa.¹⁰² É produzida por um processo contínuo de hidrólise de clorosilanos. Durante esse processo, o SiCl_4 é convertido a gás e depois reagido espontaneamente com o vapor d'água formado em uma atmosfera contendo oxigênio e hidrogênio com perda considerável de calor. O único subproduto dessa reação é o ácido clorídrico (gasoso), que é separado da sílica. Vários grupos podem ser ligados quimicamente à superfície da sílica como, por exemplo, compostos organosilícios para alteração das características superficiais (hidrofilicidade e hidrofobicidade).

Existem diversos tipos de Aerosil[®], com áreas superficiais que variam de $50 \text{ m}^2/\text{g}$ a $380 \text{ m}^2/\text{g}$, tamanho médio de partícula entre 7 nm e 40 nm e podem ser aplicados na produção de tintas e revestimentos, resinas de poliéster insaturado, resinas de laminação e gel, borracha de silicone, adesivos e selantes, tintas de impressão, cosméticos, dentre outros.⁹³ Vale ressaltar que são raros os estudos que utilizam este tipo de sílica para a imobilização de lipase, porém, quando aplicada,

tem como principal objetivo evitar as limitações de transferência de massa e, conseqüentemente, a melhoria do processo de difusão de substratos e produtos.^{103,104}

Novas rotas de obtenção de sílica ainda são descritas na literatura, como, por exemplo, o estudo realizado por Bernal *et al.*¹⁰⁵ Neste caso, a sílica foi produzida por meio da mistura de reagentes SiO₂: Na₂O: CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio): EtAc (acetato de etila): H₂O na seguinte proporção molar 1:0,3:0,24:7,2:193. A mistura foi mantida a 80 °C durante 48 h e o sólido obtido foi calcinado a 540 °C, durante 3 h. Após a derivatização hidrofílica e/ou hidrofóbica obteve-se a sílica octil (OS), glioxil (GS) e sílica octil-glioxil (OGS). Os suportes foram aplicados na imobilização de lipases de *Pseudomonas stutzeri* e *Alcaligenes* sp. para síntese de ésteres de açúcar.

Dentre os métodos de preparação de sílica, método sol-gel é sem dúvidas o mais utilizado. Este método envolve a hidrólise, policondensação e a gelação de solventes apropriados, em condições de síntese, permitindo a coexistência de espécies orgânicas e inorgânicas no mesmo sistema, seguido pela secagem convencional ou por meio pressurizado.^{78,105,3,20,77} Uma rede porosa de sílica é formada e denominada xerogel, caso a secagem seja à temperatura ambiente.^{10,74} E a sílica seca por meio pressurizado é denominada aerogel.^{66,80,106,107} Na superfície da sílica-gel observa-se a presença de grupos OH (hidroxilas) ligados quimicamente, os quais atuam como ponto de reação com os grupos funcionais de ativação do suporte ou diretamente com os grupamentos de ligação da enzima.^{32,61,108,109} As hidroxilas agem como centros de adsorção molecular ou centros de reação, formando ligações Si-O-X, durante a interação com os adsorventes capazes de formar uma ligação de hidrogênio com os grupos OH ou sofrer interações doador-receptor. (Figura 5). Os grupos OH da superfície são divididos conforme a Figura 5, na forma livre – OH formando os poros na partícula de sílica (a), grupo siloxano ≡ Si – O – Si ≡ (b), grupo silanol livre ≡ SiOH (c), silanóis associados = Si(OH)₂ (d) e silanóis vicinais ou germinal por meio de ligação de hidrogênio (e). Contudo, deve-se levar em conta que dentro do reticulado da sílica existe água no interstício da estrutura.^{3,99,110} O outro tipo de sílica utilizada para a imobilização de lipase é a mesoporosa comercial produzida também pela técnica sol-gel, denominada SBA-15, um dos novos suportes derivados de sílica amplamente estudados.^{2,6,115,118}

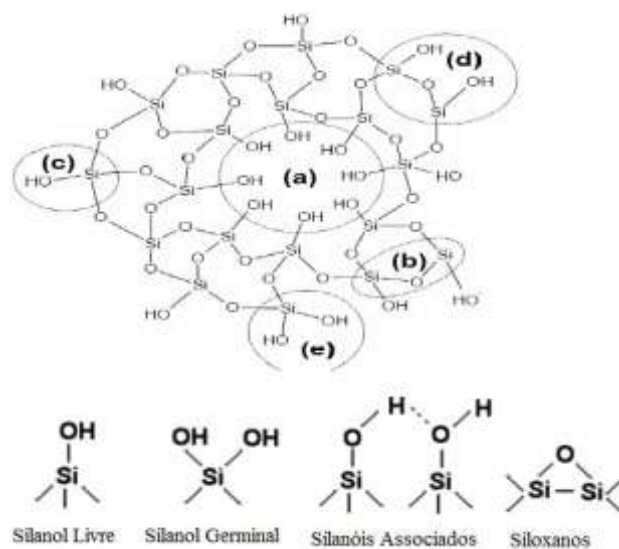


Figura 5. *Estrutura da sílica e os grupamentos presentes*

Porém, apesar da facilidade de obtenção da sílica (produzida ou comercial) e grande aplicação na imobilização de enzima, conforme Tabela 3, o aperfeiçoamento morfológico de suportes de sílica comercial ou produzida para a imobilização de biocatalisadores requer intenso estudo para que novas técnicas possam contribuir para a melhoria da estabilidade enzima aplicada aos processos biotecnológicos, como a aplicação de aditivos para modificação superficial do suporte.

Tabela 3. Sílica aplicadas na imobilização de lipases

Fonte de Lipase	Suporte	Técnica de Imobilização	Referencia
<i>Mucor miehei</i>	Sílica mesoporosa comercial	Adsorção física	Canilho <i>et al.</i> ¹¹¹
<i>Burkholderia sp.</i>	Nanopartículas de sílica	Ligação covalente	Tran <i>et al.</i> ¹¹²
<i>Rhizomucor miehei</i>	Nanopartículas de sílica	Encapsulação	Macario <i>et al.</i> ¹¹³
<i>Pâncreas suíno</i>	Sílica mesoporosa	Ligação covalente	Wang <i>et al.</i> ¹¹⁴
<i>Burkholderia cepacia</i>	Sílica gel	Encapsulação	Souza <i>et al.</i> ¹²
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SBA-15	Adsorção física	Salis <i>et al.</i> ¹¹⁵
<i>Candida rugosa</i>	Sílica mesoporosa	Adsorção física e ligação covalente	Yu <i>et al.</i> ¹¹⁶
<i>Pâncreas suíno</i>	Sílica Mesoporosa Amorfa	Adsorção Física	Wang <i>et al.</i> ¹¹⁷
<i>Pâncreas suíno</i>	SBA-15 com líquido iônico	Adsorção Física	Zou <i>et al.</i> ¹¹⁸
<i>Burkholderia cepacia</i>	Sílica com líquido iônico	Encapsulação	Barbosa <i>et al.</i> ⁸⁰
<i>Cândida rugosa e Rhizopus oryzae</i>	Sílica gel	Ligação Covalente	Lee <i>et al.</i> ⁶¹
<i>Mucormiehei e Rhizopusoryzae</i>	Sílica Mesoporosa	Adsorção Física	Gustafsson <i>et al.</i> ¹¹⁹
<i>P. fluorescens</i>	Sílica com líquido iônico	Encapsulação	Zarcula <i>et al.</i> ⁷²
<i>Burkholderia cepacia</i>	SiO ₂ -PVA	Ligação Covalente	Da Rós <i>et al.</i> ¹²⁰

MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE SÍLICA

Inúmeros suportes são relatados na literatura e muitos estão em fase de desenvolvimento, porém, antes da obtenção de um novo suporte, é também necessário promover a melhoria da superfície daqueles já existentes. Esta modificação na superfície pode ser ocasionada por meio da utilização de um aditivo durante ou após a preparação do suporte, e desta forma influenciar na área superficial, porosidade, disponibilidade de grupamentos funcionais e, consequentemente, na estabilidade de enzimas quando imobilizadas. O sucesso do

procedimento de imobilização depende da enzima a ser imobilizada e as propriedades da superfície da proteína devem ser consideradas a partir dos grupos funcionais, carga iônica e grupos hidrofóbicos.⁵³ Alguns aditivos atuam como agentes modificadores de sílica e são relatados na literatura como polietilenoglicol - PEG, álcool polivinílico - PVA, caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos – Lis.^{9,11,38,109,121}

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero formado a partir do etileno glicol, que além de muito utilizado na indústria farmacêutica, pode ser utilizado também com aditivo macromolecular durante a produção da sílica pela técnica sol gel. Outro exemplo de polímero utilizado como aditivo é polivinílico, De acordo com a literatura estes aditivos poliméricos são utilizados para imobilização de diferentes fontes de lipases e podem atuar na modificação das características físico-químicas dos materiais inorgânicos e orgânicos, na hidrofobicidade e hidrofobicidade, na condutividade elétrica, na carga iônica, na porosidade e nas propriedades mecânicas.^{11,32,89,121-}

¹²³ No estudo realizado por Soares *et al.*,⁷⁴ estes dois aditivos foram utilizados para a encapsulação da lipase de *Candida rugosa* no interior de um suporte de sílica sol-gel quimicamente inerte preparado pela policondensação do precursor tetraetoxisilano (TEOS). As propriedades da sílica e de seus derivados imobilizados foram analisadas. Nos estudos realizados por Soares *et al.*⁷⁴ e Souza *et al.*¹² foi observado que o uso do aditivo PEG proporcionou uma menor área superficial e maior volume e diâmetro dos poros da sílica obtida pela técnica sol-gel. A modificação superficial da sílica utilizando PVA apresentou efeito antagônico comparado ao PEG, isto é, ocorreu a diminuição no tamanho médio do poro da sílica na presença PVA. Tal modificação deve-se possivelmente à contração do gel na etapa de policondensação completa.

Portanto, o tipo de aditivo empregado está associado às mudanças nas características morfológicas do suporte e possivelmente do sistema imobilizado, como, por exemplo, aumento dos poros e, conseqüentemente, o aumento da difusão do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada ao suporte modificado por aditivos com efeitos positivos no processo de reticulação de obtenção da sílica.

Dentre os aditivos, a albumina foi testada em comparação com o PEG na imobilização da lipase de *Candida rugosa* por ligação covalente em sílica silanizada e ativada com γ -aminopropiltriétoxi silano (γ -APTS) e ativada com glutaraldeído, respectivamente. Os sistemas imobilizados foram aplicados na reação de esterificação para a síntese de butirato de butila e foi avaliado o rendimento da imobilização e o tempo de meia-vida dos biocatalisadores

imobilizados. O maior rendimento de imobilização (59,6%) foi obtido quando na presença de PEG e o tempo de meia-vida quando na presença do aditivo passou de 64,5 h para 176 h, em comparação com o controle.¹²⁴

Souza *et al.*¹² utilizaram o líquido hidrofóbico Aliquat[®], em diferentes concentrações (0,5 a 3,0 % m/v), na formação da sílica pela técnica sol-gel para encapsulamento da lipase de *Bacillus* sp. ITP – 001. Ao comparar a sílica pura com a sílica produzida com o aditivo, observou-se que o Aliquat[®] diminuiu a área superficial da sílica, contudo, ocorreu o aumento do volume e diâmetro dos poros. Este comportamento foi relacionado à adsorção parcial da enzima na superfície externa da sílica. Os maiores rendimentos de imobilização (71%) foram obtidos com a maior concentração de aditivo durante a formação da sílica (1,5 % m/v). Este comportamento foi atribuído ao microambiente hidrofóbico benéfico à enzima e ao maior tamanho dos poros proporcionado pelo aditivo. Portanto, a enzima foi imobilizada na superfície e no interior dos poros, sem comprometimento da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, resultou em maior rendimento de imobilização e maior eficiência da reação enzimática.

Os líquidos iônicos (LIs) são utilizados na biocatálise como solventes verdes e agentes de modificação superficial da sílica. Os LIs são compostos formados na sua maioria por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico e são baseados nos princípios da química verde, visando processos químicos ambientalmente mais limpos, sendo conhecidos principalmente como substituintes de solventes orgânicos voláteis em meios reacionais.¹²⁵⁻¹²⁷ De acordo com o avanço das pesquisas e patentes sobre líquidos iônicos observou-se o aumento em escala logarítmica desde a década de 80 e, especificamente nos últimos 10 anos, tem-se utilizado LIs como agentes na imobilização de catalisadores.^{9,125,127-130} Segundo Naushad *et al.*,¹²⁸ os LIs têm mostrado o seu potencial como solvente em reações enzimáticas, alterando a estrutura, a atividade, a enantioseletividade e a estabilidade das enzimas. Assim, é de extrema necessidade o conhecimento dos efeitos químicos de líquidos iônicos sobre a estrutura, estabilidade e atividade de enzimas, o que será útil para os pesquisadores em várias aplicações biocatalíticas.

Uma outra alternativa para aplicação dos líquidos iônicos é o seu uso como agentes de modificação superficial da sílica. Os líquidos iônicos (LIs) são classificados em apróticos e próticos. Os LIs apróticos (LIA) são aqueles considerados bons doadores de prótons e formam ligação de hidrogênio, constituídos principalmente dos cátions orgânicos a base do imidazólio, piridino, tetraalquilamônio e tetraalquilfosfônio, os quais ainda apresentam elevados custos de

síntese, o que dificulta sua aplicação industrial.^{2,6,72} Líquidos iônicos próticos (LIP) possuem um próton de alta mobilidade, são resultantes da combinação de um ácido e uma base de Bronsted e possuem vantagens como baixo custo, simplicidade de síntese e baixa toxicidade, favorecendo a biocompatibilidade com as lipases.^{130,131}

Recentemente o líquido iônico é aplicado como aditivo no protocolo de imobilização, durante o processo de imobilização da lipase por encapsulação ou no tratamento do suporte para imobilização por ligação covalente, exibindo aumento na eficiência operacional e estabilidade catalítica do biocatalisador imobilizado.^{9,61,66,72,132-134} De acordo com Karout e Pierre,¹³⁵ a presença de LIs como aditivos pode influenciar a estrutura da sílica gel, aumentando o tamanho do poro e protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima, evitando a desnaturação da enzima pela presença de álcool.

Na literatura trabalhos são relatados com modificação da superfície do suporte de sílica comercial (SBA-15) com LI apróticos, tais como o estudo de Zou *et al.*,¹¹⁸ os quais utilizaram líquidos iônicos apróticos baseados em imidazol adicionados na superfície sílica mesoporosa, SBA-15. A caracterização físico-química e morfológica dos suportes e biocatalisadores mostraram que o tratamento com líquido iônico para modificação superficial não causa impedimento na ligação da enzima e suporte, demonstrando a indução de um número relativamente elevado de líquido iônico e enzima dentro dos canais mesoporosos do suporte e o aumento da eficiência catalítica.

O mais recente trabalho realizado por Zou *et al.*⁶ utilizou a sílica comercial mesoporosa de baixo custo obtida comercialmente da Makall Chemical Technology Co., Ltd. (Qingdao, China). A sílica foi modificada com diferentes agentes baseados em trimetoxipropilsilano ou líquido iônico como fonte de grupamento alcoxissilano, que reagem com grupamentos de hidroxila da SiO₂. Os resultados mostraram que o líquido iônico foi mais eficiente do que fontes convencionais de alcoxissilano, com rendimento de imobilização da lipase de pâncreas suíno de 97% e a atividade relativa superior a 62% após cinco ciclos.

Hu *et al.*² relataram que a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* também em SBA-15 modificado com diferentes líquidos iônicos apróticos foi uma estratégia eficiente para melhoria da estrutura de poros, do fortalecimento das interações enzima superfície e das propriedades do sistema imobilizado (estabilidade térmica e operacional, capacidade de reutilização, estabilidade de armazenamento e estabilidade em solventes orgânicos). A eficiência da

imobilização neste estudo, além da melhoria da estrutura do suporte, deve-se também ao microambiente formado pela amina e o LI, mantendo assim a conformação favorável da enzima.

No entanto, para o uso de líquido iônico próticos pode-se analisar o estudo realizado por Souza *et al.*⁹ para encapsulação da lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica sol-gel. Neste estudo foram utilizados líquidos iônicos próticos baseados em monoetanolamina com diferentes comprimentos de cadeia alquílica e em diferentes concentrações (0,5 - 3,0% m/v). Os rendimentos de imobilização das lipases resultaram em valores elevados quando comparados ao sistema imobilizado na ausência de LI, com aumento da eficiência catalítica em 35 vezes. O efeito positivo observado foi atribuído ao revestimento que o LI proporcionou aos poros e à superfície do suporte selecionado (sílica), além da proteção da estrutura da lipase durante a obtenção do biocatalisador imobilizado, atuando como um agente estabilizador da enzima e protetor contra a inativação pelo álcool durante a encapsulação.

A modificação superficial do suporte ocorre também por meio da adição de grupos funcionais específicos na superfície do suporte e é aplicada também como pré-requisito para a imobilização de uma enzima em uma superfície sólida. Quando tais grupos estão ausentes, o suporte é submetido a uma modificação química por meio de agentes sinalizantes e/ou bifuncionais.^{48,136-138} A modificação superficial utilizando agentes silanizadores baseia-se na silanização com organosilanos, a qual ocorre por meio da reação entre grupos reativos do tipo alcoxi (metoxi, etoxi) presentes em alcoxissilanos mono, bi ou trifuncionais e os silanóis superficiais da matriz inorgânica. O material resultante contém cadeias orgânicas pendentes que podem ser covalentemente ligadas por meio de ligações do tipo $\equiv\text{Si-O-Si-R}$, sendo hidrolíticas e termicamente estáveis, em que R representa uma cadeia orgânica contendo um grupo funcional específico. Já os agentes bifuncionais promovem uma forte ligação entre o suporte (silanizados ou não) e os grupamentos presentes na enzima, como hidroxil, mercapto, ou amina, permitindo uma flexibilidade conformacional mais ampla.^{1,18,70,139} As reações na superfície do suporte podem ser por: diazotização, formação de ligação amida, alquilação e arilação, formação de base de Schiff, reação de Ugi, reações de amidinação, troca do dissulfeto-tiol, interações enzima-mercúrio e ligação induzida por radiação.^{31,59,60}

Dentre estes agentes, os mais utilizados são 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltrióxissilano e 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodi-imida, etilenodiamina, glicidol,

carbodiimidazol e outros.^{14-16,62} Na Figura 6 é possível verificar ampla gama de grupos funcionais que podem ser adicionados após modificação na superfície da sílica para imobilização de lipases, de acordo com Hartmann e Kostrov.¹⁴⁰

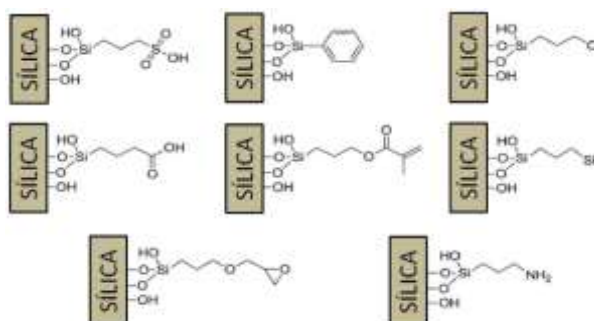


Figura 6. Ativação de suporte de sílica com diferentes grupos bifuncionais

Paula *et al.*¹⁴¹ imobilizaram pela técnica de adsorção física e ligação covalente a lipase de *Candida rugosa* em matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA). Na imobilização da lipase por adsorção física em POS-PVA previamente neutralizado com solução aquosa de NaOH foi verificado o rendimento de imobilização de 96,5%. Quando utilizado o suporte ativado com agente bifuncional glutaraldeído foi verificado um pequeno decréscimo na atividade e no rendimento quando comparado aos mesmos parâmetros referentes à imobilização por em POS-PVA puro, 81,5%. Esta diferença pode ter sido ocasionada pela modificação conformacional da enzima durante a etapa de fixação no suporte ativado com glutaraldeído, no qual altera a estrutura tridimensional do sítio ativo da enzima, tornando partes da molécula enzimática inacessíveis ao substrato palmitato de *p*-nitrofenila. Porém, vale ressaltar que apesar do pequeno decréscimo no rendimento de imobilização, o sistema obtido por adsorção física apresentou uma perda acentuada da atividade de esterificação na segunda batelada, com subsequente perda total na terceira batelada, o que correspondeu a um tempo de meia-vida de 39 h. Essa perda foi menos significativa quando comparada ao sistema obtido por ligação covalente utilizando o agente glutaraldeído, mantendo-se por seis bateladas e tempo de meia-vida de 81 h.

No estudo realizado por Yang *et al.*¹⁴² a lipase de *Arthrobacter* sp. foi imobilizada pelo método de ligação covalente convencional e o de ligação cruzada. O glutaraldeído foi utilizado na modificação da sílica obtida pela técnica sol-gel e utilizada como suporte. Após imobilização foi possível alcançar melhores propriedades catalíticas, permitindo a reutilização do

biocatalisador imobilizado pelo método de ligação cruzada por 9 vezes. A maior eficiência no método de ligação cruzada deve-se a duas etapas durante a imobilização: na primeira etapa ocorre a ligação covalente da enzima ao suporte e na segunda etapa ocorre a agregação das enzimas por meio da adição do glutaraldeído, obtendo-se, assim, o reticulado do sistema imobilizado. Portanto, o aumento global da atividade catalítica do sistema reticulado em comparação com o biocatalisador imobilizado apenas por ligação covalente unipontual, deve-se possivelmente à maior carga de enzima alcançada nesta técnica de imobilização.^{56,106,143} Nos espectros de FTIR apresentados no trabalho, é possível verificar os picos presumivelmente da imina de base de Schiff produzida pela reação da amina com glutaraldeído.

Santos *et al.*³² produziram um suporte obtido pela técnica sol-gel utilizando os precursores tetraetoxissilano (TEOS) e álcool polivinílico (PVA) para imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* por ligação covalente utilizando o agente epicloridrina. Os resultados foram comparados com suporte tratado com o agente glutaraldeído, para os quais foram obtidos os maiores rendimentos de imobilização e eficiências de imobilização em sistemas utilizando sílica ativada com epicloridrina. A eficiência obtida se deve à maior presença de pontos de ligação covalente entre a enzima e o suporte, fenômeno confirmado por meio da determinação das propriedades morfológicas. O diferente comportamento durante a ativação do suporte indica que diferentes modificações químicas foram produzidas por cada agente de ativação. Durante a ativação com glutaraldeído ocorreu provavelmente uma reação entre o grupamento carbonila do aldeído e os grupos hidroxila do PVA, por meio do mecanismo acetal, deixando uma extremidade do glutaraldeído formada por um grupamento carboxila que poderá se ligar ao grupo NH₂ da enzima. Por outro lado, quando a epicloridrina é utilizada, grupos epoxi são formados na superfície do suporte e apenas um grupamento hidroxila é necessário para a ligação. Consequentemente, um maior número de sítios ativos da enzima estará disponível para imobilização devido à maior reatividade dos grupos epóxi. As suposições do tipo de reação foram confirmadas pelo espectro de FTIR, no qual após modificações químicas do suporte o pico correspondente ao grupo hidroxila foi menor para epicloridrina comparado ao glutaraldeído. E os picos intensos e estreitos foram encontrados nos difratogramas de raios-X, evidenciando assim a estrutura cristalina da lipase livre presentes nos derivados imobilizados em suporte modificado superficialmente com o agente epicloridrina.¹⁴⁴

A sílica obtida por Bernal *et al.*¹¹⁰ por meio da mistura de reagentes SiO₂: Na₂O: CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio): EtAc (acetato de etila): H₂O: H₂O passou por um processo de derivatização para sua modificação superficial, obtendo-se três tipos de suporte:

hidrofílico com a presença de grupos glioxila (SG), suporte hidrofóbico com grupos octila (SO) e suporte hidrofílico-hidrofóbico com ambos (SGO). As lipases de *Pseudomonas stutzeri* e *Alcaligenes* sp. foram imobilizadas por ligação covalente multipontual de acordo com cada suporte, com a finalidade de favorecer a formação de Bases de Schiff entre grupos aldeído do suporte e grupos de resíduos de lisina na superfície da proteína amino-ε. O suporte SGC foi o suporte mais eficiente para imobilização das lipases e aplicação na síntese de ésteres de açúcar, permitindo maior ativação interfacial e estabilização da enzima imobilizada covalente na sua superfície modificada. A nanopartícula de sílica coloidal, assim denominada por Cruz *et al.*¹⁰³ 2010, na presença de modificadores da estrutura: 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e ditioneitol (DTT), foi aplicada para imobilização da lipase de *Candida antarctica* lipase B (CALB) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL) por adsorção física. Os biocatalisadores imobilizados foram aplicados em reações na presença de solventes orgânicos. Observou-se que foi possível o revestimento da superfície sólida do suporte modificado com a lipase com impedimento da limitação de transferência de massa. Baseando-se no perfil apresentado nesta revisão bibliográfica, pode-se afirmar que o uso de aditivos em estudos propostos por pesquisadores desde 2000 apresentaram resultados promissores na modificação de sílica. Nos primeiros estudos foram verificados efeitos positivos e negativos na modificação da superfície da sílica com uso de PEG, compostos de poli-hidroxil, albumina, gelatina, sorbitol, glicerol ou triacilgliceróis.¹⁴⁵ A partir destes resultados recentes descritos na literatura e discutidos nesta revisão podemos afirmar a necessidade da continuidade de estudos relacionados ao uso de diferentes aditivos na modificação da sílica e a aplicação na imobilização de enzimas.

CONCLUSÃO

O desafio do estudo da modificação das superfícies da sílica nos últimos anos tem apresentado o desenvolvimento de suportes para imobilização de enzimas que permitam a conversão catalítica por meio de processos ambientalmente corretos. A sílica utilizada na imobilização de enzimas é um suporte atrativo ao setor industrial devido à sua segurança toxicológica e promoção da estabilidade da enzima e a sua reutilização. Portanto, a modificação superficial da sílica supre a necessidade de desenvolvimento de novos suportes, pois a sílica pode ser modificada a fim de proporcionar maiores interações com a enzima quando utilizados para catalisar uma série de reações de grande valor agregado e os exemplos descritos nesta revisão mostram que a imobilização de enzimas em sílica é bastante promissora na preparação de biocatalisadores ativos e que há a necessidade de novas metodologias para melhoria da imobilização de enzimas que ainda poderão ser exploradas.

AGRADECIMENTOS

À UNIT, FAPITEC, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Zhou, Z.; Hartmann, M.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3894.
2. Hu, Y.; Tang, S.; Jiang, L.; Zou, B.; Yang, J.; Huang, H.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 2291.
3. Zhuravlev, L. T.; *Colloids. Surf. A.* **2000**, *173*, 1.
4. Sheldon, R. A.; Pelt, S. V.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223.
5. Ispas, C.; Sokolov, I.; Andreescu, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 543.
6. Zou, B.; Song, C.; Xu, X.; Xia, J.; Huo, S.; Cui, F.; *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *311*, 62.
7. Yang, J.; Hu, Y.; Jiang, L.; Zou, B.; Jia, R.; Huang, H.; *Bioch. Eng J.* **2013**, *70*, 46.
8. Xu, Y. Q.; Zhou, G. W.; Wu, C. C.; Li, T. D.; Song, H. B.; *Solid State Sci.* **2011**, *13*, 867.
9. Souza, R. L.; Faria, E. L. P.; Figueiredo, R. T.; Freitas, L. S.; Iglesias, M.; Mattedi, S.; Zanin, G. M.; Santos, O. A. A.; Coutinho, J. A. P.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *52*, 141.
10. Carvalho, N. B.; Barbosa, J. M. P.; Oliveira, M. V. S.; Fricks, A. T.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 52.
11. Soares, C. M. F.; Santos, O. A.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 69.
12. Souza, R. L.; Resende, W. C.; Barao, C. E.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *84*, 152.
13. Mendes, A. A.; Castro, H. F.; Giordano, R. L. C.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 245.
14. Oliveira, I. R. W. Z.; Fernandes, S. C.; Vieira, I. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 366.
15. Gomes, F. M.; Paula, A. V.; Silva, G. S.; Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 710.

16. Li, N.; Bai, R.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 6692.
17. Ansari, S. A.; Husain, Q.; *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 512.
18. Talbert, J. N.; Goddard, J. M.; *Colloids Surf., B.* **2012**, *93*, 8.
19. Zhu, J.; Sun, G.; *React. Funct. Polym.* **2012**, *72*, 839.
20. Kapoor, M.; Gupta, M. N.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555.
21. Narwal, S. K.; Gupta, R.; *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 479.
22. Zhang, B.; Weng, Y.; Xu, H.; Mao, Z.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 61.
23. Barbosa, J. M. P.; Souza, R. L.; Melo, C. M.; Fricks, A. T.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1173.
24. Moura, C. V. R.; Nunes, A. S. L.; Moita Neto, J. M.; Neres, H. L. S.; Carvalho, L. M. G.; Moura, E. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1226.
25. Liu, W.; Chen, B.; Wang, F.; Tan, T.; Deng, L.; *Proc. Biochem.* **2011**, *46*, 1993.
26. Akoh, C. C.; Chang, S.; Lee, G.; Shaw, J.; *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 8995.
27. Hasan, F.; Shah, A. A.; Hame, E. A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
28. Carvalho, N. B.; Oliveira, M. A. S.; Fricks, A. T.; Franceschini, E.; Dariva, C.; Zanin, G. M.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *99*, 130.
29. Basri, M.; Kassim, M. A.; Mohamad, R.; Ariff, Q. B.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85*, 214.
30. Haigh, K. F.; Saha, B.; Vladisavljevic, G. T.; Reynolds, J. C.; *Procedia Eng.* **2012**, *42*, 1106.
31. Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo M. L. Em *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado in Imobilização de Enzimas sua Estabilização*; Castro, H. F.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; Sá-Pereira, .1^a ed., Inteciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 6.
32. Santos, J. C.; Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52*, 49.

33. Pinheiro, R.; Soares, C.; Santos, O.; Castro, H.; Moraes, F.; Zanin, G.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52*, 27.
34. Gog, A.; Roman, M.; Tosa, M.; Paizs, C.; Irimie, F. D.; *Renewable Energy* **2012**, *39*, 10.
35. Da Rós, P. C. M.; Freitas, L.; Perez, V. H.; Castro, H. F.; *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2013**, *36*, 443.
36. Paques, F. W.; Macedo, G. A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 93.
37. Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 146.
38. Reetz, M. T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 527.
39. Baron, A. M.; Barouh, N.; Barea, B.; Villeneuve, P.; Mitchell, D. A.; Krieger, N.; *Fuel* **2014**, *117*, 458.
40. Abdulla, R.; Ravindra, P.; *Biomass Bioenerg.* **2013**, *56*, 8.
41. You, Q.; Yin, X.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *148*, 202.
42. Aryee, A. N. A.; Dutilleul, P.; Paszti, M.; Simpson, B. K.; *Fuel Process. Technol.* **2013**, *109*, 103.
43. Da Rós, P. C. M.; Castro, H. F.; Carvalho, A. K. F.; Soares, C. M. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 529.
44. Dalal, S.; Singh, P. K.; Raghava, S.; Rawat, S.; Gupta, M. N.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2008**, *51*, 23.
45. Schrag, J. D.; Li, Y.; Cygler, M.; Lang, D.; Burgdorf, T.; Hecht, H. J.; Schmid, R.; Schomburg, D.; Rydel, T. J.; Oliver, J. D.; Strickland, L. C.; Dunaway, C. M.; Larson, S. B.; Day, J.; Mcpherson, A.; *Structure* **1997**, *5*, 187.
46. Quintella, C. M.; Teixeira, L. S. G.; Korn, M. G. A.; Neto, P. R. C.; Torres, E. A. C. M.; Jesus, C. A. C.; *Quim. Nova* **2009**, (ed. especial).
47. Hilterhaus, L.; Liese, A. Em *Biocatalysis for the pharmaceutical industry in Discovery, development, and manufacturing*, Tao, J.; Lin, G.-Q.; Liese, A., eds.; John Wiley & Sons: Singapore, 2009.

48. Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B.; *Adsorption* **2014**, *20*, 801.
49. Hanefeld, U.; Cao, L.; Magner, R.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6211.
50. Sheldon, R. A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 467.
51. Sheldon, R. A.; *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289.
52. Cantone, S.; Ferrario, V.; Corici, L.; Ebert, C.; Fattor, D.; Spizzo, P.; Gardossi, L.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6262.
53. Liese, A.; Hiltterhaus, L.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6236.
54. Brena, B. M.; Batista-Viera, F.; *Methods in Biotechnology in Immobilization of Enzymes and Cells*, 4th ed., Guisan © Humana Press Inc.: Totowa, 2006.
55. Guncheva, M.; Zhiryakova, D.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 1.
56. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.
57. Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P.; *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1017.
58. Hernandez, K.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 107.
59. Fernandes, P.; Cabral, J. M. S. Em *Biotransformation in Basic Biotechnology*, v. 3; Ratledge, C; Kristiansen, B., eds.; Cambridge University Press, 2006.
60. Zanin, G. M.; Moraes, F. F. Em *Enzimas como agentes biotecnológicos*; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap. 4.
61. Lee, C.; Lin, T.; Mou, C.; *Nano Today* **2009**, *4*, 165.
62. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C.; Castro, H. F.; Giodano, R. L. C.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 831.
63. Secundo, F.; Miehé-Brendlé, J.; Cheralu, C.; Ferrandi, E. E.; Dumitriu, E.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *109*, 350.
64. Christensen, M. W.; Andersen, L.; Husum, T. L.; Kirk, O.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 318.

65. Bornscheuer, U. E.; Bessler, C.; Srinivas, R.; Hari Krishna, S.; *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 433.
66. Kharrat, N.; Ali, B. A.; Marzouk, S.; Gargouri, Y.; Karra-Châabouni, M.; *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1083.
67. Torres, M. P. G.; Foresti, M. L.; Ferreira, M. L.; *Biochem. Eng. J.* **2014**, *90*, 36.
68. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/537322?lang=pt®ion=BR>, acessada em Setembro 2014.
69. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/62350?lang=pt®ion=BR>, acessada em Setembro 2014.
70. Orrego, C. E.; Salgado, N.; Valencia, J. S.; Giraldo, G. I.; Giraldo, O. H.; Cardona, C. A.; *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 9.
71. Mozhaev, V. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Sergeeva, M. V.; Sikrnis, V.; Martinek, K.; *Biocatal. Biotransform.* **1990**, *3*, 179.
72. Zarcuła, C.; Corîci, L.; Croitoru, R.; Ursoiu, A.; Peter, F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 79.
73. Reetz, M. T.; *Sci, Adv. Mater.* **1997**, *9*, 943.
74. Soares, C. M. F.; Santos O. A.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *113*, 307.
75. Macario, Q.; Moliner, M.; Corma, A.; Giodano, G.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *118*, 334.
76. Hilterhaus, L.; Thum O.; Liese, A.; *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 618.
77. Gerardin, C.; Reboul, J; Bonne, M.; Lebeau, B.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4217.
78. Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 623.
79. Scherer, R. P.; Dallago, R. L.; Penna, F. G.; Bertella, F.; Oliveira, D.; Oliveira, J. V.; Pergher, S. B. C.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2012**, *1*, 290.

80. Barbosa, A. S.; Silva, M. A. O.; Carvalho, N. B.; Mattedi, S.; Inglesias, M. A.; Fricks, A. T.; Lima, A. S.; Franceschi, E.; Soares, C. M. F.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 969.
81. Pilkington, P. H.; Margaritis, A.; Mensour, N. A.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1998**, *18*, 237.
82. Romdhane, I. B. B.; Romdhane, Z. B.; Gargouri, A.; Belghith, H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 230.
83. Brígida, A. I. S.; Pinheiro, A. D. T.; Ferreira, A. L. O.; Pinto, G. A. S.; Gonçalves, L. R. B.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *136*, 67.
84. Grosso, C.; Ferreira-Dias, S.; Pires-Cabral, P.; *J. Food Eng.* **2013**, *115*, 475.
85. Hou, C.; Zhu, H.; Wu, D.; Li, Y.; Hou, K.; Jiang, Y.; Lim, Y.; *Process. Biochem.* **2014**, *49*, 244.
86. Cabrera-Padilla, R.Y.; Albuquerque, M.; Figueiredo, R. T.; Fricks, A. T.; Francheschi, E.; Lima, A. S.; Andreo, O. A. S.; Silva, D. P.; Soares, C. M. F.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, *1*, 2.
87. Salis, A.; Pinna, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 19.
88. Nunes, P. A.; Pires-Cabral P.; Guillén M.; Valero F.; Ferreira-Dias S.; *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2012**, *89*, 1287.
89. Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Santos, J. C.; Castro, H. F.; *Int. J. Food. Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2124.
90. Andrade, L. H.; Rebelo, L. P.; Netto, C. G. C. M.; Toma, H. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *66*, 55.
91. Kumar, D.; Nagar, S.; Bhushan, I.; Kumar, L.; Parshad, R.; Gupta, V. K.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *87*, 51.
92. Galarneau, A.; Muresanu, M.; Atger, S.; Renard, G.; Fajula, F.; *New J. Chem.* **2006**, *30*, 562.
93. Degusa S/A. *Basic characteristics of AEROSIL®*. Technical Bulletins Fine Particles, **1993**.

94. Matte, C. R.; Nunes, M. R.; Benvenuti, E. V.; Schöffler, J. N.; Ayub, M. A. Z.; Hertz, P. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *78*, 51.
95. Dizge, N.; Keskinler, B.; Tanriseven, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *66*, 34.
96. Silva, G. S.; Inoune, D. Y.; Dors, G.; Fugiro, J. A.; Castro, H. F.; *Acta Sci.* **2011**, *33*, 197.
97. Almeida, R. V.; Branco, R. V.; Peixoto, B.; Lima, S. S.; Alqueres, S. M. C.; Martins, S. M. C.; Freire, D. M. G.; *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39*, 531.
98. Vilar, R. B. C.; Jesus, A.; Benvenuti, E. V.; Silva, M. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 285.
99. Benvenuti, E. V.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1926.
100. Airoidi, C.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 144.
101. Duran, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C.; *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, 1^a ed., Artliber: São Paulo, 2006.
102. Parida, S. K.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *121*, 77.
103. Cruz, J. C.; Pfromm, P. H.; Tomich J. M.; Rezac, M. E.; *Colloids Surf., B.* **2010**, *79*, 97.
104. Kramer, M.; Cruz, J. C.; Pfromm, P. H.; Rezac, M. E.; Czermak, P.; *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 80.
105. Bernal, C.; Illanes, A.; Wilson, L.; *Langmuir* **2014**, *30*, 3557.
106. Gao, S.; Wang, Y.; Wang, W.; Luo, G.; Dai, Y.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *62*, 218.
107. Liu, G.; Yang, R.; Li, M.; *J. Non-Cryst. Solids* **2010**, *356*, 250.
108. Yang, G.; Wu, J.; XU, G.; YANG, L.; *Colloids Surf., B.* **2010**, *78*, 351.
109. Hu, Z.; Hu, Y.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H.; *Biochem. Eng. J.* **2010**, *53*, 150.
110. Soares, C. M. F.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77*, 745.
111. Canilho, N.; Jacoby, J.; Pasc, A.; Carteret, C.; Dupire, F.; Steb, M. J.; Blin, J. L.; *Colloids Surf., B.* **2013**, *112*, 139.

112. Tran, D.; Chen, C.; Chang, J.; *J. Biotechnol.* **2012**, *158*, 112.
113. Macario, A.; Verri, F.; Diaz, U.; Corma, A.; Giordano, G.; *Catal. Today* **2013**, *204*, 148.
114. Wang, C.; Zhou, G.; Li, Y.; Lu, N.; Song, H.; Zhang, L.; *Colloids Surf., A* **2012**, *406*, 75.
115. Salis, A.; Casula, M. F.; Bhattacharyya, M. S.; Pinna, M.; Solinas, V.; Monduzzi, M.; *Chem Cat Chem* **2010**, *2*, 322.
116. Yu, W. H.; Fang, W.; Tong, D. S.; Shao, P.; Xu, T. N.; Zhou, C. H.; *Biochem. Eng J.* **2013**, *70*, 97.
117. Wang, X. Zhou, G.; Zhang, H.; Du, S.; Xu, Y.; Wang, C.; *J. Non-Cryst. Solids* **2011**, *15*, 3027.
118. Zou, B.; Hu, Y.; Yu, D.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H.; *Biochem. Eng. J.* **2010**, *53*, 150.
119. Gustafsson, H.; Johansson, E. M.; Barrabino, A.; Oden, M.; Holmberg, K.; *Colloids Surf., B* **2012**, *100*, 22.
120. Da Rós, P. C. M.; Silva, G. A. M.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Castro, H. F.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *101*, 5508.
121. Freitas, L.; Paula, A. V.; Santos, J. C.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 87.
122. Moreira, A. B. R.; Perez, V. H.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *Energy Fuels* **2007**, *21*, 3689.
123. Bruno, L. M.; Coelho, J. S.; Melo, E. H. M.; Lima-Filho, J. L.; World J.; *J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *21*, 189.
124. Soares, C. M. F.; Santana, M. H. A.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 832.
125. Mai, N. L.; Ahh, K.; Koo, Y.; *Process Biochem.* **2014**, *49*, 872.
126. Kato, K.; Kawachi, Y.; Nakamura, H.; *J. Asian Ceram. Soc.* **2014**, *2*, 2014.
127. Mohammad, F. A.; Amin A. S.; *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2012**, *16*, 5770.

128. Naushad, M.; Alothman, Z. A.; Khan, A. B.; Ali, M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 555.
129. Oliveira, M. V. S.; Da Rós, P. C. M.; Mattedi, S.; Castro, H. F.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S.; *Acta Sci. Technol.*, in press.
130. Alvarez, V. H.; Mattedi, S.; Martin-Pastor, M.; Aznar, M.; Iglesias, M.; *Fluid Phase Equilib.* **2010**, *299*, 42.
131. Kato, R.; Gmehling, J.; *Fluid Phase Equilib.* **2004**, *226*, 37.
132. Hara, P.; Mikkola, J. P.; Murzin, D. Y.; Kanerva, L. T.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 129.
133. Hara, P.; Hanefeld, U.; Kanerva, L. T.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 250.
134. Karout, A.; Pierre, A. C.; *J. Non-Cryst. Solids* **2007**, *353*, 2900.
135. Cho, E. J.; Jung, S.; Kim, H. J.; Lee, Y. G.; Nam, K.C.; Lee, H. J.; Bae, H. J.; *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 886.
136. Wu, C.; Zhou, G.; Jiang, X.; Ma, J.; Zhang, H.; Song, H.; *Proc. Biochem.* **2012**, *47*, 953.
137. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C.; Velez, A. M.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; Castro, H. F.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 503.
138. Zaidan, U. H.; Rahman, M. B. A.; Othman, S. S.; Basr, M.; Abdulmalek, E.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Salleh, A. B.; *Food. Chem.* **2012**, *131*, 199.
139. Zhang, Z.; He, F.; Zhuo, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *94*, 129.
140. Hartmann, M.; Kostrov, X.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6277.
141. Paula, A. V.; Moreira, A. B. R.; Braga, L. P.; Castro, F.; Bruno, L. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 35.
142. Yang, G.; Wu, J.; Xu, G.; Yang, L.; *Colloids Surf., B.* **2010**, *78*, 351.
143. Cruz, J.; Barbosa, O.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R.; Torres, R.; Ortiz, C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *80*, 7.

144. Araujo, A. M.; Neves Jr., M. T.; Azevedo, W. M.; Oliveira, G. G.; Ferreira Jr., D.L.; Coelho, R. A. L.; Figueiredo, E.A.P.; Carvalho Jr., L. B.; *Biotechnol. Tech.* **1997**, *11*, 67.

145. Villeneuve, P.; Muderhwa, J.; Graille, J.; Graille, J.; Hass, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *9*, 113.

Capítulo IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados os resultados e discussão por meio de três artigos:
Artigo II, III e IV.

ARTIGO II

Protic ionic liquid: an alternative additive for obtaining modified silica and after applied in lipase immobilization by covalent binding

Nayara B. Carvalho¹; Bruna T. Vidal¹; Anderson dos Santos Barbosa¹; Matheus M. Pereira¹;
Silvana Mattedi²; Lisiane dos S. Freitas³; Alini T. Fricks¹; Álvaro S. Lima¹; Cleide M. F.
Soares^{1*}

¹ Institute of Technology and Research, University Tiradentes, Aracaju-SE, Brazil.

² Department of Chemical Engineering, Federal University of Bahia, Salvador-BA, Brazil.

³ Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, São Cristovão-SE, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 79 3218 2190. Address: Av. Murilo Dantas, Farolândia,
CEP: 49032-490. E-mail address: cleide.soares@pq.cnpq.br

Abstract: The novel enzyme support strategy is the modified silica with protic ionic liquid (PIL) and bifunctional agents (glutaraldehyde and epichlorohydrin) was used in the effective immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC) by covalent binding. The biocatalysts with the highest yields of immobilization, LBC immobilized by covalent binding with epichlorohydrin without (203%) and with PIL (250%), were assessed by the following the hydrolysis reaction of olive oil and characterized biochemically (Michaelis–Menten constant, optimum pH and temperature and operational stability). Further, the potential transesterification activity for three substrates: sunflower, soybean and colza oils, was also determined, achieving a conversion of ethyl esters between 70 and 98%. The supports and the immobilized lipase systems were characterized using Fourier transform infrared spectra (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), elemental analysis and thermogravimetric (TG) analysis.

Keywords: modified silica support; protic ionic liquid; lipase from *Burkholderia cepacia*; immobilization; hydrolysis; transesterification.

Introduction

Free or immobilized lipases are the most studied class of enzymes in biotechnology, receiving attention both in academia and in industry because of the recent improvement in biocatalytic enzyme performance in different reactions.¹⁻⁴ Efficient immobilization is the result of the perfect matching of several factors depending on the enzyme, the process, the immobilization support and the additives used for modification supports.⁵⁻⁹ Therefore, the use of an appropriate support can influence the biocatalyst physical-chemical properties, such as diffusion and catalytic efficiency on each specific reaction system.¹⁰⁻¹²

Thus, tailored solutions must be developed for each specific process of interest. Indeed, direct investigation of what occurs concerning the catalytic efficiency, morphology and physical chemistry, is quite a formidable task and the differences observed in the performance of the immobilized enzyme system must be interpreted very carefully. In any study dealing with enzyme immobilization, the prerequisite is the rigorous planning and reporting of experiments.⁶

An alternative method for support enhancement in enzymatic immobilization is the modification of a silica surface support using an ionic liquid as an additive. The application of an additive has as its main goals a positive influence in the gel structure modification, the addition of silanol groups on the surface, an increase in surface area and pore size and the enhancement of the protective hydration layer on the enzyme, which prevents enzyme denaturation in the presence of alcohol.^{3,7,10,11,13-15}

Protic ionic liquids (PIL) are the result of the combination of an acid and a Bronsted base presenting high proton mobility, low cost, easy synthesis and low toxicity, and favoring biocompatibility with lipases.^{7,16} From the studies conducted by the present research group, of which this article forms part, it was found that the surface modification of silica with PIL for lipase immobilization by encapsulation positively influences the catalytic efficiency of the different lipases tested.^{7,17,18} The literature suggests that surface modification of the support with aprotic IL positively influences the silica surface support due to the structure of the IL. However, up to now the surface modification of silica with protic ionic liquid for lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by physical adsorption or covalent binding has not been reported.

Surface modification of the silica support also occurs via the addition of specific functional groups and is a prerequisite for the immobilization of an enzyme by covalent binding to a solid surface.^{5,6,19} Other surface modifications using e.g. silanized agents based on silanizing with organosilanes, occur by reaction between the reactive groups of alkoxy (methoxy, ethoxy) alkoxy silanes present in mono, bi or tri-functional groups and the silanol on the carrier surface.^{20,21} In addition, bifunctional agents or spacer arms (epichlorohydrin, glutaraldehyde, glyoxal, formaldehyde, carbodiimide, ethylenediamine, glycidol, carbonyldiimidazole and others) are also used for the surface modification of silica, their function being to promote a strong attachment between the support (silanized or otherwise) and the immobilized enzyme. Bifunctional agents may interact with the groups present on the enzyme, such as hydroxyl, mercapto or amine groups, allowing a larger conformation and flexibility for the immobilized system.^{22–27}

In this context, the aim of the present work was the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* by covalent binding onto supports obtained by a sol-gel technique modified with protic ionic liquid (PIL), N-methylmonoethanolamine pentanoate, and bifunctional agents (epichlorohydrin and glutaraldehyde). Moreover, evaluation of this potentially useful biocatalyst in hydrolysis and transesterification reactions was performed. In addition, biochemical characterization of the immobilized system under standard reaction conditions was performed (Michaelis–Menten constant, pH and temperature optimum and operational stability in the hydrolysis of olive oil). The supports and the immobilized system were characterized regarding particle size distribution, specific surface area, pore size distribution by Brunauer–Emmett–Teller (B.E.T. method), thermogravimetric analysis (TG), scanning electron microscopy (SEM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) seeking to confirm the positive effect of silica surface modification by PIL on lipase immobilization.

Materials and methods

Materials

Lipase from *Burkholderia cepacia* (Amano Lipase, ≥ 2200 U.g⁻¹, pH 7.0, 50°C) was purchased from Sigma Aldrich (Japan). The silane precursor tetraethoxysilane (TEOS) was supplied by Across Organic (NJ, USA) and used without further purification. Ethanol (99% pure), ammonia (28% pure), hydrochloric acid (36% pure) and Arabic gum were obtained from

Synth (São Paulo, Brazil). Water was purified by reverse osmosis and deionized through a Milli-Q four-cartridge organic-free water purification system. Olive (low acidity), sunflower, soybean and colza oils were purchased at a local market. For covalent binding the bifunctional agents glutaraldehyde or epichlorohydrin from Sigma Aldrich were used. The protic ionic liquid N-methylmonoethanolamine pentanoate was supplied by the Federal University of Bahia (UFBA). Other chemicals were of analytical grade and used as purchased.

Silica support preparation by the sol-gel technique

The methodology used was as previously established by Souza *et al.*⁷ with some modifications. For the mesoporous silica with protic ionic liquid 1% (w.v⁻¹) of N-methylmonoethanolamine pentanoate was added, for the silica without ionic liquid this step was excluded (control).

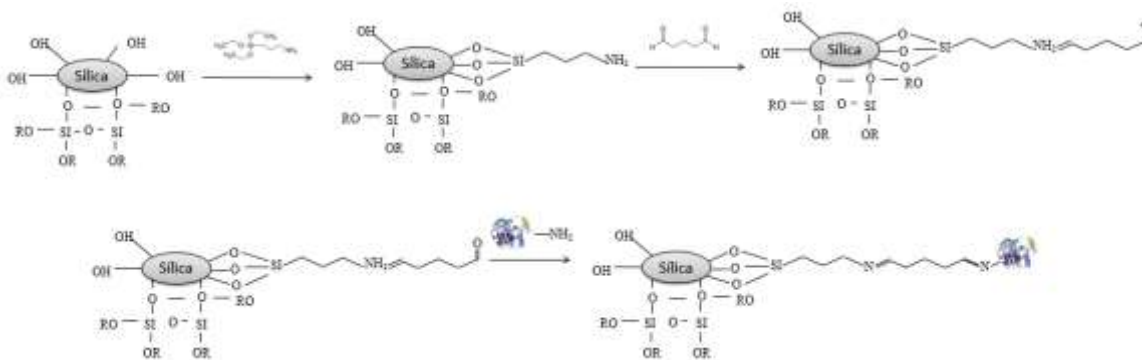
Two supports, the silica control support produced without ionic liquid (SC) and a silica support modified using ionic liquid (SIL), were obtained.

Lipase immobilization by covalent binding

Lipase from *Burkholderia cepacia* was immobilized by covalent binding on the silica support (SC or SIL) using two bifunctional agents: glutaraldehyde or epichlorohydrin.

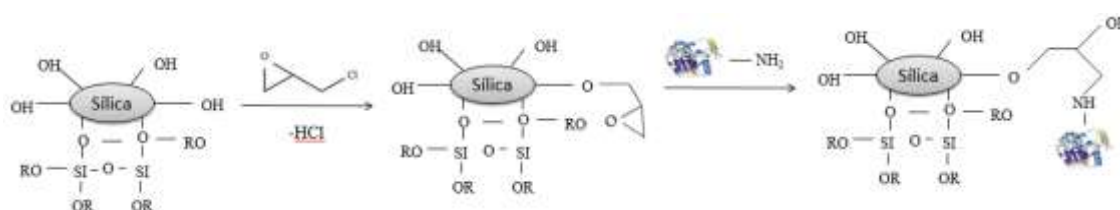
For covalent binding with glutaraldehyde the silica support (SIL or SC) was silanized with γ -APTS (com γ -aminopropiltriétoxi silano) followed by a reaction with glutaraldehyde solution, and then lipase was immobilized according to the procedure described by Soares *et al.*²⁷ with reported modifications (Scheme 1).

The mesoporous silica (SC or SIL) (1 g dry wt) was soaked previously in hexane under agitation (100 rpm) for 15 min. A 0.25 g lipase aliquot was dissolved in 10 mL of distilled water and then added to the solution. The fixation of lipase onto the support was performed under agitation for 3 h at room temperature and followed by an additional period of 18 h under static conditions at 4 °C. The derivative was filtered and thoroughly rinsed with hexane. All two preparations of immobilized biocatalysts onto support control (SC) or support modified with ionic liquid (SIL) of were denominated CBG-SC and CBG-SIL, respectively.



Scheme 1. Possible reaction mechanisms of the silica support with functional activating agents glutaraldehyde and lipase.

Using epichlorohydrin as bifunctional agent, lipase was immobilized following the methodology of Soares *et al.*²⁷, with slight modifications (Scheme 2). Activation of modified silica was carried out with epichlorohydrin at 2.5% (w.v⁻¹) pH 7.0 for 1 h at room temperature, followed by washings with distilled water. Support activated was soaked into hexane under stirring (100 rpm) for 1 h at 25 °C. Then, excess of hexane was removed and lipase was added at a ratio of 1:4 gram of enzyme per gram of support. PEG-1500 (5mg.g⁻¹) was added together with the enzyme solution at a fixed amount (100 µl.g⁻¹ of support). Lipase-support system was maintained in contact for 16 h at 4 °C under static conditions. The immobilized systems were denominated CBE-SC and CBE-SIL, respectively.



Scheme 2. Possible mechanism reactions for silica support with functional activating agents epichlorohydrin and lipase.

Enzymatic hydrolysis and transesterification activity

Enzymatic hydrolysis activities of free or immobilized lipase were assayed using the olive oil emulsion method according to literature.²⁸ The liberated fatty acids in enzymatic hydrolysis were titrated with potassium hydroxide solution (0.04 M) in the presence of phenolphthalein as an indicator. All enzymatic activity determinations were replicated at least three times. One unit

(U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 μmol of free fatty acid per min (μmol.min⁻¹). Analyses of hydrolytic activities were carried out on the lipase loading solution and the immobilized preparations to determine the yield immobilization, Y_a (%), according to Equation 1²⁹:

$$Y_a (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

where U_s corresponds to the total enzymatic activity immobilized on the support, and U_0 represents the enzyme units offered for immobilization.

The immobilized lipase systems with higher yields of immobilization were used for biochemical characterization in an olive oil hydrolysis reaction and vegetable oil (soybean, colza and sunflower) transesterification.

Transesterifications reactions catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* were performed under the conditions proposed by Oliveira *et al.*¹⁸ with the stated modifications. The transesterification reactions (5g of total mass) were carried out in batch reactors, submerged in a thermostatic bath to keep each mixture at constant temperature and under agitation. The reaction was started by mixing oil (colza, soybean or sunflower oil) and ethyl alcohol (molar ratio 1:7), with lipase from *Burkholderia cepacia* (20% w.w⁻¹) immobilized by covalent binding with epichlorohydrin, proportional to the total weight of reactants in the reaction media, and maintained for 96 h at 40 °C and 80 rpm, with analysis every 24h.

Sample containing purified esters (0.1 g) were added in a 10 mL volumetric flask and completed with hexane, collected after stirring was 100 μL of the sample and put in a 1 mL flask together with 100 μL of internal standard solution (methyl heptadecanoate at a concentration of 250 mg.mL⁻¹) and supplemented again with hexane (10 mL). Aliquots were taken at different time intervals and analyzed by a GC gas chromatograph (Shimadzu 2010) equipped with a CARBOWAX (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) column. Column temperature was initially kept at 140 °C for 1 min, increasing to 180 °C at a rate of 4 °C per minute, maintained for 2 min, then increased to 230 °C at a rate of 10 °C per minute, where it was maintained for additional 10 min. The temperatures of the injector and detector were set to 250 °C.

Ethyl ester conversion (%) was defined as the observed amount of product divided by the theoretical yield if all the oil was converted.

The analyzed sample was prepared by mixing of esters previously purified with standard solution. Aliquot of the sample was then injected in to the chromatograph with a 10 mL glass needle. The yield calculation in esters was carried out based on the mass and areas under the peaks corresponding to the ethyl and methyl esters, and on the internal standard, using Equation (2). Conversion analyses were performed in duplicate.

$$Conversion(\%) = \frac{(A_E - A_{IS})}{A_{IS}} \times \frac{(C_{IS})}{C_E} \times 100 \quad (2)$$

where: A_E = sum of the peak areas corresponding to the esters in the sample; A_{IS} = peak area corresponding to the internal standard; C_{IS} = internal standard concentration; C_E = esters concentration.

Temperature and pH effect on lipase activity in the hydrolysis reaction

The effect of pH on the activity of free and immobilized lipase was analyzed between pH 2.0 – 10 at 37 °C. The buffers used were 0.1 M citric acid-sodium citrate (pH 2.0 – 5.0), 0.1 M potassium phosphate (pH 5.0 – 8.0), and 0.1 M bicarbonate-carbonate (pH 8.0 – 10). The optimal temperature for activity of the immobilized lipase system was determined in the range of 25 – 80 °C, at the previously determined optimum pH.

Operational stability in the hydrolysis reaction

The operational stability of the immobilized lipase system was determined by conducting hydrolysis reactions (olive oil) in consecutive batches using the same immobilized lipase. Each batch consisted of 10 min of hydrolysis reaction at the optimum reaction pH and temperature. At the end of each batch, the immobilized system was removed from the reaction medium, and washed with hexane in order to remove any substrate or product retained in the support. The immobilized system was then reused for another reaction cycle using new substrates. The relative activity of each run was calculated by setting the original activity as 100%.

Kinetic parameters in the hydrolysis reaction

To calculate the Michaelis–Menten constant (K_m and V_{max}), reaction systems were prepared containing fatty acids at concentrations ranging from 37 to 2232 mM obtained from emulsions containing different proportions of olive oil (1–60%) and aqueous solution of Arabic gum (7% w/v), in accordance with the proposed method by Cabrera-Padilla *et al.*³⁰ The Michaelis–Menten constant (K_m) and the concentration of substrate at which half of the maximum reaction rate (V_{max}) was reached were calculated by nonlinear fitting using the program Origin 8.0.

Morphological and physicochemical characterization of silica supports and immobilized systems

After determining the highest yields for both preparations (CBE-SC and CBE-SIL), three control preparations (LBC, SC and SIL) were used for morphological and physicochemical characterization. The surface area of the silica support and the immobilized system were measured by adsorption, using nitrogen as the adsorbate according to Souza.⁷ The surface area ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) was calculated using the Brunauer, Emmett, and Teller (B.E.T.) method. Pore volume ($\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$), diameter (Å) and area distributions based on BJH calculation were evaluated by the B.E.T. apparatus software (Model NOVA – Surface Area & Pore Size Analyser, Quantschome Instruments). Thermogravimetric (TG) curves were obtained using a TG, Perkin Elmer Pyris1 apparatus, under a nitrogen atmosphere that started at room temperature and went up to 1000 °C, increasing at a heating rate of 10 °C.min⁻¹.

The thermogram was divided into three regions as a function of temperature and the percentage of the mass loss was calculated using Equation 3.

$$\text{Mass Loss (\%)} = \left(\frac{w_f - w_i}{w_f} \right) \times 100 \quad (3)$$

in which w_i and w_f are the initial and final weight of samples, respectively.

Scanning electron microscopy (model Hitachi S4100i, accelerating potential of 30 kV to 500 V and 15 Å resolution) was also used to characterize the surfaces of the samples. The samples of LBC, SC, SIL, CBE-SC, and CBE-SIL were submitted to FTIR analysis (Perkin Elmer). Spectra were obtained in the wavelength range 500 to 4000 cm^{-1} .

Results and discussion

Immobilization yield

The immobilization yield of the two preparations of immobilized lipase onto silica supports obtained by a sol-gel technique with and without IL (control) was investigated using an olive oil hydrolysis reaction as a model.^{7,18,28,30,31} The yields of enzymatic hydrolysis experiments carried out using CBG-SC, CBG-SIL, CBE-SC and CBE-SIL were 21, 23, 203 and 250%, respectively (Table 1). Between the two types of immobilization procedure for covalent binding, using glutaraldehyde or epichlorohydrin. Epichlorohydrin as the bifunctional agent showed higher immobilization yield values. Therefore, the modification of the silica for immobilization showed improve of the 250%.

Table 1. Immobilization yield of the two preparations of immobilized lipase onto silica.

Bifunctional agent	Support	Immobilization yield (%)
CBG	SC	21
	SIL	23
CBE	SC	203
	SIL	250

According to Forde *et al.*³² glutaraldehyde is frequently used for immobilization of soluble enzymes in order to increase on the hydrophobicity of support, and authors report that lipases undergo hyperactivation in the presence of highly hydrophobic supports.^{33,34} However, the positive influence of this bifunctional agent depends on the type of enzyme and support and according to the report by Minovska *et al.*³⁵ and although hyperactivation of lipase on glutaraldehyde-support is expected, a strong decrease on the activity was observed.

The authors associate the low yield with conformational change in the enzyme during the stage of attachment to the support activated with glutaraldehyde. This could be due to possible functional agent toxicity to some enzymes.^{36,37} This behavior was also observed by Mendes *et al.*²⁶, in the immobilization of *Thermomyces lanuginosa* lipase by covalent binding on different supports (poly-hydroxybutyrate, bagasse and hybrid hydrogels). Immobilized lipases prepared with bifunctional agents such as glycidol and epichlorohydrin were more active

in organic and aqueous media than those biocatalysts immobilized onto supports activated with glutaraldehyde agent.

On the other hand, hyperactivation of the enzyme was reached by activation with epichlorohydrin. These results could be attributed to different orientations of the enzyme on the support surface.³⁸⁻⁴⁰ This behavior was also observed by Mendes *et al.*²⁶, in the immobilization of *Thermomyces lanuginosa* lipase by covalent binding on different supports (polyhydroxybutyrate, bagasse and hybrid hydrogels). Immobilized lipases prepared with bifunctional agents such as glycidol and epichlorohydrin were more active in organic and aqueous media than those biocatalysts immobilized onto supports activated with glutaraldehyde agent.

The behavior observed by Mendes *et al.*²⁶ and Paula *et al.*³⁷ was further explained by Barbosa *et al.*⁴¹, who reported that the optimal activation (in terms of reactivity) for silica supports is activation with two glutaraldehyde molecules per amino group on the support, generating a quite reactive (although not fully determined) structure with the amino residues of the enzyme. Moreover, glutaraldehyde dimers confer some hydrophobicity to the support surface, and they may affect the immobilization of some enzymes. For example, lipases exhibit so-called “interfacial activation” and this involves the movement of a polypeptide chain “lid” that may isolate the active site from the medium. This flexibility of the active centre of lipases allows their functional properties (activity, selectivity, specificity) to be easily modulated, positively or negatively, through several techniques.^{42,43}

Based on these results, enzyme molecules immobilized on the support activated with epichlorohydrin could be oriented toward reaction medium whereas that the immobilization on glutaraldehyde support some enzyme molecules could be oriented toward support surface, thus reducing the access of substrate molecules. Due to its high reactivity (see references above described), different orientations of the enzyme on the support activated with dialdehyde is expected which also could distort the three-dimensional structure of the enzyme.^{33-34,38-40}

Besides, when epichlorohydrin is used as a bifunctional agent, epoxy groups are formed on the support surface and only one hydroxyl group is needed for the reaction, compared to the two groups required by glutaraldehyde. This means that a higher number of active sites for enzyme binding are available on the silica activated with epichlorohydrin. This fact, as well as

the known higher reactivity of epoxy groups, could explain the higher immobilization yield achieved with epichlorohydrin as activating agent.^{27,44,46}

Biochemical, morphological and physicochemical characterization was performed only for the biocatalysts showing higher yields of immobilization. Thus, the characterization of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto silica support without (SC) and with (SIL) ionic liquid is presented.

Biochemical Characterization

Temperature and pH effect on lipase activity

In this study, pH and temperature effect were evaluated as well as their influence on the interaction of free lipase or immobilized lipase system with the surrounding microenvironment. For each immobilized system it was necessary to define the optimal pH since pH has a variety of effects on the ionization state, enzyme dissociation, enzyme conformational change and has a profound effect on hydrolytic activity after the immobilization process.²²⁻²⁴ Figure 1 depicts the pH influence on lipase immobilization.

For lipase from *Burkholderia cepacia* free the optimal pH was 7.0 (Figure 1a), while the optimum pH for immobilized enzyme was shifted to 3.0 (Figure 1a e 1b). The change might be caused by the characteristics of the modified support and immobilization method (covalent binding) and can be attributed to alteration of various intermolecular interactions such as ion-dipole, dipolar, dispersion, and H-binding between the enzyme and the modified silica support with IL.^{3,25,45}

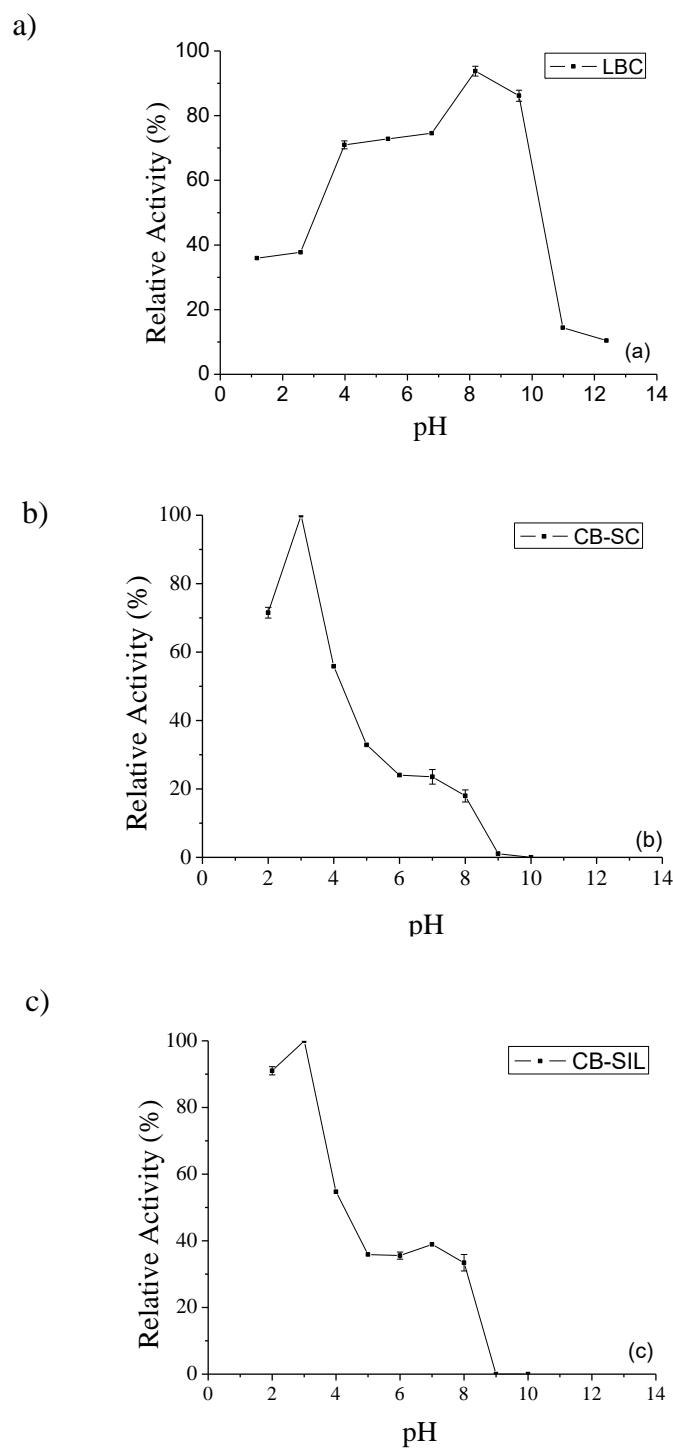


Figure 1. Effects on relative activity under various pH and temperature values. Ranging from pH 2 to pH 10 at 37°C for lipase from *Burkholderia cepacia* free (LBC) (a), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced without IL (b), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced without ionic liquid (c).

According to Hu *et al.*¹¹ immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* in mesoporous silica SBA-15 modified by imidazole based ionic liquids was more stable to pH change in the pH 7.0 to range of 6.0 at 8.0, compared with that immobilized lipase in unmodified SBA-15. As indicated above, pH adaptability is associated with the charge of the supports. The presence of cations in ILs might reduce their sensitivity at low pH and improve the structure and the adaptability of the immobilized enzyme system. Thus the shift of optimal pH in this study was from neutral towards acid.

The temperature dependence of the relative activity of free and immobilized system was investigated by measuring the hydrolysis of emulsified olive oil at different temperatures (from 25°C up to 80°C) and the results are shown in Figure 2. The optimal temperature for the free enzyme was approximately 50°C, while for the immobilized enzymes the optimal temperature was 45°C. This result shows that immobilization resulted in a lower activation energy for the enzyme. The higher activation energy for the free enzyme implies an increased energy barrier, meaning that the immobilized enzyme does not need an elevated temperature to attain its highest activity.²⁵ Similar results have been reported in literature, where the optimum temperature of the immobilized lipase was in the range of 40–60°C.^{11,27,31,45}

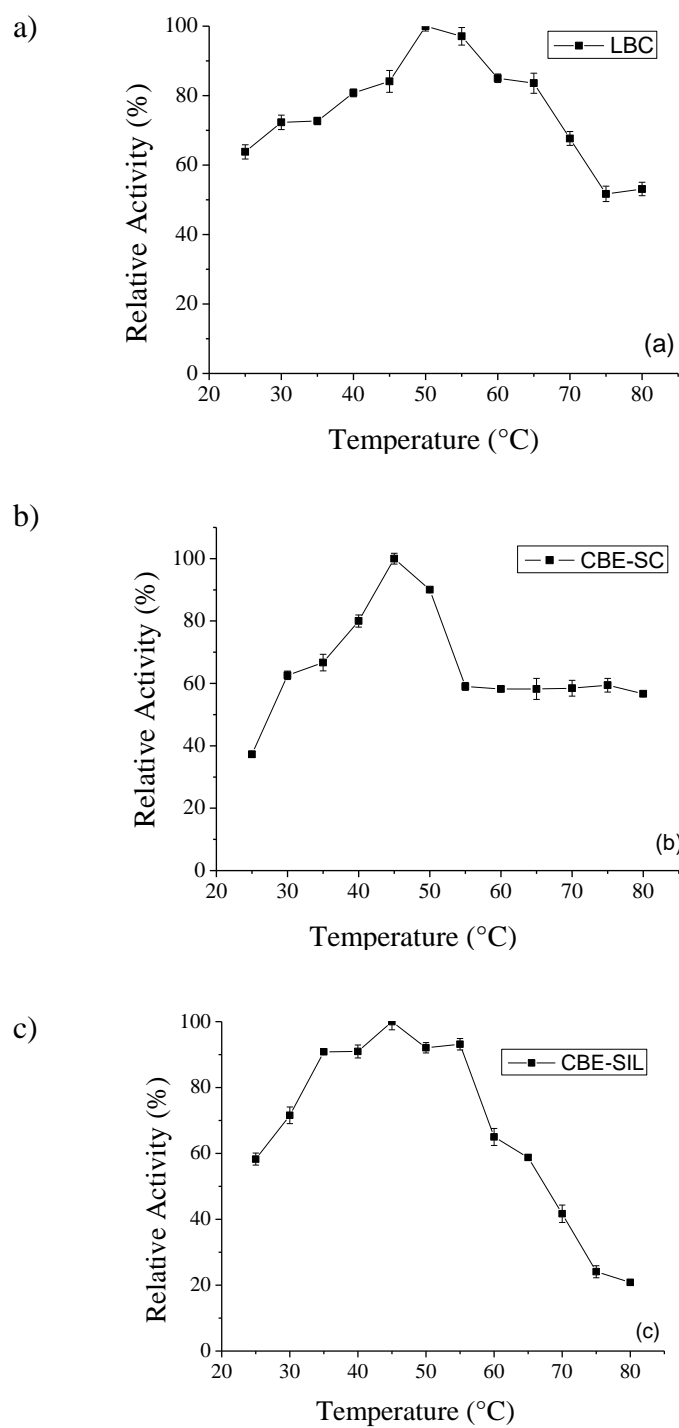


Figure 2. Effects on relative activity under ranging from 25 to 80 °C for lipase from *Burkholderia cepacia* free (LBC), pH 7.0 (a), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced with IL, pH 3.0 (b), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto support produced without ionic liquid, pH 3.0 (c).

Determination of Kinetic Parameters

Kinetic constants of free and immobilized LBC were determined by using olive oil emulsification solution as substrate in the hydrolysis reaction. The Michaelis–Menten constant K_m and the initial maximum reaction velocity V_{max} of the immobilized LBC were calculated by nonlinear fitting using the program Origin[®] 8.0., where K_m determines the affinity of the enzyme for a particular substrate and V_{max} determines the maximum rate of reaction. Table 2, shows that the K_m and V_{max} of the free enzyme were 249 mM and 1836 U.g⁻¹, respectively, and after the immobilization, the biocatalysts had a higher V_{max} when compared to the free enzyme. The yield of immobilization was confirmed as 203 % for CBE-SC and 250% for CBE-SIL.

Table 2. The Michaelis constant (K_m) and the maximum reaction velocity (V_{max}) of the free enzyme determined by measuring initial rates of the reaction. Where free lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC), immobilized by covalent binding without ionic liquid (CBE - SC) and immobilized with ionic liquid (CBE – SIL), are compared.

Biocatalysts	V_{max} (U.g ⁻¹)	K_m (mM)
LBC	1.836	249
CBE-SC	2.718	99
CBE-SIL	3.801	149

The apparent V_{max} values were consistent with the K_m values. The results suggested that the IL modification increased the affinity of the enzyme and substrate. The affinity of an enzyme for a substrate is high if the K_m value is low. According to Cabrera-Padilla *et al.*³⁰, the higher affinity for substrate obtained in the case of the immobilized enzyme could be explained by the hydrophobic microenvironment of the immobilized enzyme attracting the substrate which is also hydrophobic, resulting in the obtained values for K_m . Similar observations were made by Barbosa *et al.*⁴¹ and Carvalho *et al.*³¹ while evaluating the K_m of lipase extracted from *Bacillus* sp., ITP-001 in the hydrolysis reaction of olive oil, where they obtained K_m values of 105 and 14 mM for free and immobilized enzyme, respectively.

When comparing the lipase system immobilized onto supports control or modified with IL, it could be observed that the K_m was higher for the biocatalysts immobilized onto supports modified with IL. This feature is possibly due to the greater porosity of the modified support and immobilization of lipase inside pores, indicating that the affinity towards the substrate was reduced when compared to enzyme immobilized only on the surface of the control support.⁴⁶

The maximum reaction speed of the immobilized system increased after immobilization of the enzyme. This suggests that the enzyme may have undergone a positive conformational change during immobilization, which affected the reaction rate, and could have influenced the diffusional mass transfer of substrate to the immobilized enzyme.^{1,30,47}

The kinetic studies of lipase-catalyzed conversions have been scarcely studied and require further investigation because each process involves different parameters such as lipase type, lipase immobilization, the solvent used, temperature, reactant concentrations, mass transfer limitations as well as the parameters affecting the ping-pong bi-bi mechanism proposed for lipase.^{48,49}

Operational stability of hydrolytic activity

The operational stability of the immobilized enzyme system is one of the important characteristics that can help to reduce industrial process operation costs since to use the free enzyme, it is necessary to constantly add new enzyme loadings and when the enzymes are immobilized they may be used in multiple cycles or in a continuous process.^{25,50}

Figure 3 shows the variation of CBE-SC and CBE-SIL relative activity after reuse. Lower activities of CBE-SC were measured after seven cycles of use, reaching 17% at 17 cycles. This suggested that the lipase was stripped off the channels of SC in the separating and washing steps during the recycling because it was only attached onto the silica surface. CBE-SIL maintained approximately 50% of its initial activity after the eighteenth cycle, which confirms that it has a more stable structure than CBE-SC.

Yang *et al.*³, Hu *et al.*¹¹ and Zou *et al.*^{51,52} showed greater variation of immobilized lipase activity in functionalized mesoporous silica SBA-15 modified by ionic liquid, decreasing after each cycle and reducing rapidly in the initial period. This behavior was due possibly to the weak molecular interactions between the enzymes and supports through simple physical adsorption or but it may also have been a conformational change in the enzyme structure during the ballads. Therefore, other immobilization methods such as covalent binding should be considered to further improve the reusability of immobilized lipases. In addition, these studies demonstrate that besides the surface modification of silica, it is also necessary to choose an appropriate method of enzyme immobilization that provides stronger molecular interactions between enzymes and supports.

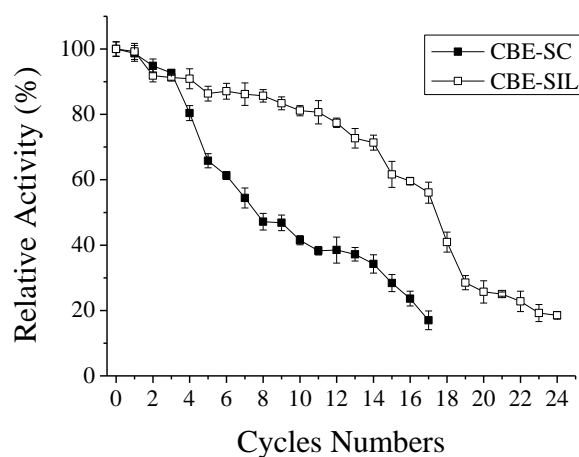


Figure 3. Operational stability of the lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding. Reactional conditions were: 45 °C, pH 3.0, during 10 min and 80 rpm.

Transesterification activity

Figure 4 shows the conversion to ethyl esters by transesterification of three oil types using lipase immobilized by covalent binding onto silica without protic ionic liquid (CBE-SC) and with protic ionic liquid (CBE-SIL).

Three oil types (soybean, colza and sunflower oil) were used to assess transesterification performance of the immobilized lipases. Lipase immobilized by covalent binding onto silica without protic ionic liquid (CBE-SC) achieved 89% conversion of ethyl esters in 48 hours for soybean oil. However, using the biocatalyst immobilized onto modified silica with protic ionic liquid (CBE-SIL) conversion of soybean oil achieved almost 93% (72 h) ethyl ester conversion. For colza, the CBE-SC was more efficient reaching 98% conversion in 72 h. For sunflower oil, a 92% conversion was obtained after 72 h when using the CBE-SIL and 73% using the CBE-SC after 72h. Therefore, it can be considered that lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding was effective for the transesterification reaction.

In the literature, there are no studies using lipases immobilized by covalent binding to modified silica with IL for the synthesis of ethyl esters. Oliveira *et al.*¹⁸ performed the encapsulation of LBC with a protic ionic liquid (N-methylmonoethanolamine pentanoate) and applied it in the transesterification of babassu oil and ethanol (molar ratio 1:7). Conversions of 52% were obtained in conventional medium. Only after increasing the enzyme load through

covalent binding in the already immobilized biocatalyst was it possible to see an increase in the reaction performance leading to a 98% conversion (96h).

It can be concluded that using ionic liquid for silica surface modification for covalent binding immobilization promoted higher conversions, without or with ionic liquid using a conventional process, between 48 and 96 h. Figure 4d shows the highest conversions obtained at 72 h. It can be concluded that the immobilized system onto support produced using ionic liquid presented higher immobilization yields for soybean and sunflower, but for colza oil a higher conversion percentage was obtained for the biocatalyst immobilized on control support.

Therefore, observed that ethyl ester production using immobilized biocatalysts is an interesting alternative process due to the moderate reaction temperatures. Also, unlike chemical catalysis which works better with methanol, immobilized enzymes seem to prefer ethanol.⁵³⁻⁵⁵ Another major influence on ethyl ester production (for biodiesel) is the triglyceride feedstock, which depends on regional availability and economic conditions. Many vegetable oils can be used, such as soybean, sunflower, palm, colza, rapeseed, castor oil, cottonseed, jatropha, ricebran, coconut, hazelnut, pistachio, karanja, neam, mahu, caster, safallow, and jojoba.^{53,56-58}

The main differences among these vegetable oils are the fatty acid compositions, which strongly affect the production of esters. According to Resolution No. 482 (Technical Rules for Identity Fixation and Quality of Vegetable Fats and Oils), of September 23, 1999 ANVISA (National Health Surveillance Agency)⁵⁹ the vegetable oils used in this study (sunflower soybean and colza) are compounds mostly containing fatty acids of between 16 and 18 carbons, as shown in Table 3.

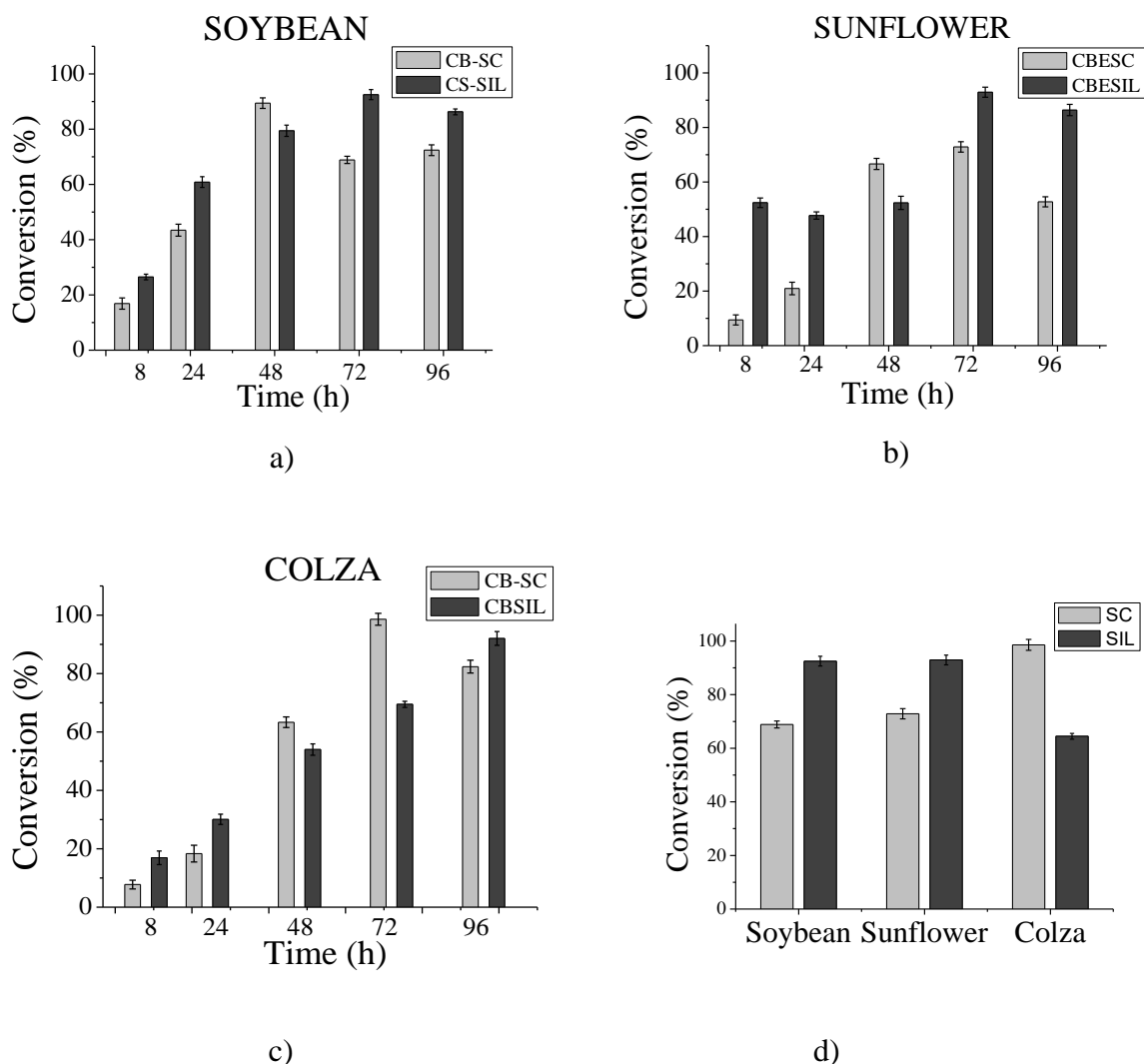


Figure 4 Time course of ethyl ester conversion using lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding. Experiments considered under a 40°C, 96 h of reaction and stirring at 80 rpm. Lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding using different oils: soybean (a), sunflower (b) or colza (c). In image (d) a comparison between the three oil types for aliquots taken at 72h of reaction under the already described conditions, is seen.

According to Salis *et al.*⁶⁰ substances such as phospholipids and waxes in oils may negatively affect enzyme activity. The observed differences in transesterification by the immobilized lipase are possibly due to the fatty acid composition of the oils studied (Table 3). The highest conversion was obtained for colza oil (98%). Assessing the fatty acid content of the oils used, the highest conversion was possibly due to the greater presence of oleic acid chain

when compared to the higher amounts of linoleic acid chains (18:2) present in soybean oil and sunflower oil.

Table 3. Composition of soybean, sunflower and colza oil fatty acids, comparing fatty acids, carbon chain and their nomenclature

Fatty acids	Nomenclature	Soybean Oil	Sunflower Oil	Colza Oil
C 14:0	Myristic	< 0.5	< 0.5	< 0.2
C 16:0	Palmitic	7.0–14.0	3.0–10.0	2.5–6.5
C 16:1	Palmitoleic	< 0.5	< 1.0	< 0.6
C 18:0	Stearic	1.4–5.5	1.0–10.0	0.8–3.0
C 18:1	Oleic	19.0–30.0	14.0–35.0	53.0–70.0
C 18:2	Linoleic	44.0–62.0	55.0–75.0	15.0–30.0
C 18:3	Linolenic	4.0–11.0	< 0.3	5.0–13.0
C 20:0	Arachidic	< 1.0	< 1.5	0.1–1.2
C 20:1	Eicosenoic	< 1.0	< 0.5	0.1–4.3
C 22:0	Behenic	< 0.5	< 1.0	< 0.6
C 22:1	Erucic		< 0.5	< 2.0
C 24:0	Lignoceric		< 0.5	< 0.2
C 24:1	Tetracosenóico		< 0.5	< 0.2

From ANVISA (National Health Surveillance Agency) ⁵⁵

Da Ros *et al.*⁴⁶ concluded that there was no significant difference in transesterification of babassu oil and tallow beef when using lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding on two different non-commercial matrices, an inorganic matrix (niobium oxide, Nb₂O₅) and a hybrid matrix (polysiloxane–polyvinyl alcohol, SiO₂–PVA). Independent of the feedstock, both immobilized derivatives were able to form the main fatty acids ester from these raw materials. However, both reaction rates and yields were influenced by the support and activating agents used for immobilizing the lipase. This same effect can be observed when used lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized onto supports produced with or without ionic liquid in this study.

Morphological and physicochemical characterization

Scanning electron microscopy (SEM)

According to the literature, direct investigation of the catalytic efficiency of supported or immobilized lipase systems is necessary.⁶ SEM micrographs of the lipase from *Burkholderia cepacia* free and immobilized onto silica support prepared with ionic liquid and on the control support are shown in Figure 5.

Figure 5a shows that the lipase from *Burkholderia cepacia* has a rounded shape. It can be observed that the support in the presence of IL showed high surface porosity, with formation of a layer of porous channels with irregular shapes (Figure 5c) and the support without IL and immobilized presented low porosity (Figure 5b and d).

The micrographs in Figure 4e show differences in the structure of the immobilized lipase system. Support produced using IL shows a predominance of pores for the immobilization of lipase by a covalent bifunctional agent such as epichlorohydrin. In conclusion, ionic liquid and the bifunctional agent promoted physical changes in the support and resulted in a more porous and efficient support for immobilization. According to Da Ros *et al.*⁴⁶, the SEM also allows the verification of morphological differences between pure and activated SiO₂-PVA supports. After the modification with epichlorohydrin, small fissures were verified, which may help the fixation of the enzyme on the support.

The higher activity yield obtained indicated that some sort of change occurs in the mechanism of the enzyme system on modified silica with IL and epichlorohydrin. Speculation about the mechanism is possible with data from biochemical and physicochemical characterization.

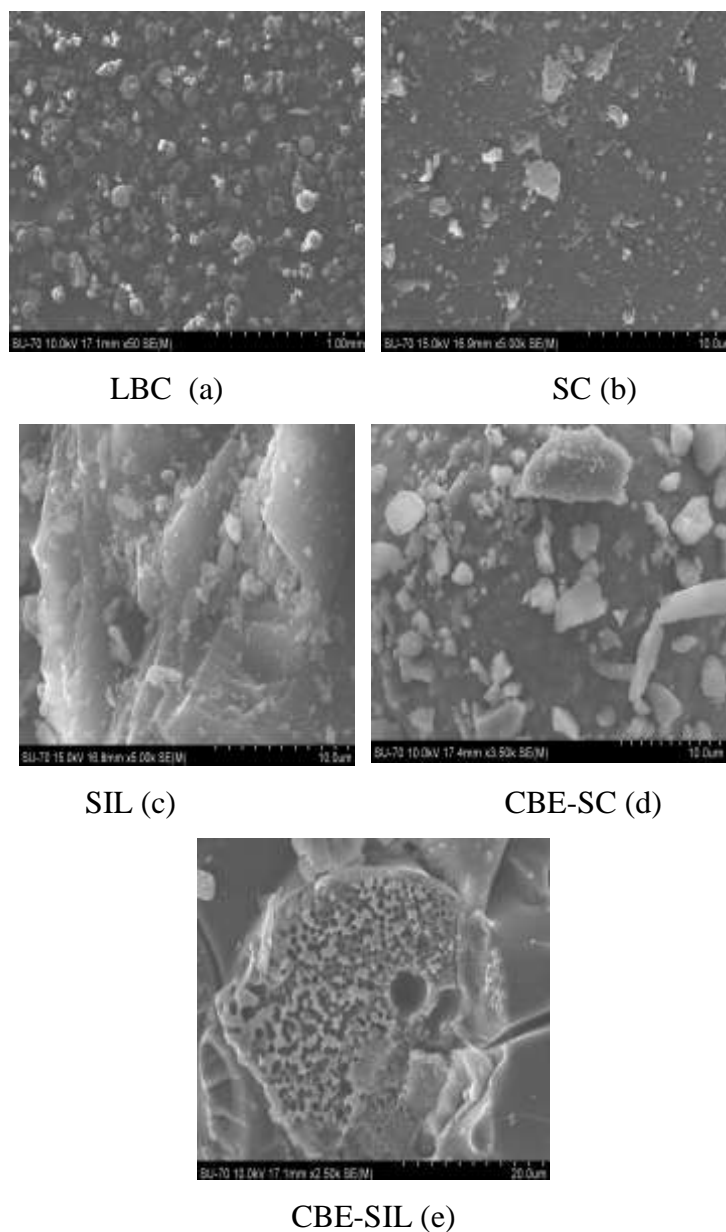


Figure 5. Scanning electron micrographs of lipase from *Burkholderia cepacia* (a) presenting a spherical form. In (b) it is possible to see control silica support and (c) presenting silica support produced with protic ionic liquid. The lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto control silica (d) and lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto silica produced with protic ionic liquid (e).

Specific surface area and porosity

The determination of the specific surface area and pore size is based on the volume of nitrogen gas adsorbed at various pressures at 77 K (-196 degrees Celsius). The results of surface

area measurement, diameter and pore volume for the silica support and immobilized system are shown in Table 4.

The results for the specific surface area indicated a significant increase of specific surface area when the ionic liquid was added to the support synthesis (from 799.5 m².g⁻¹ (SC) to 853.5 m².g⁻¹ (SIL). This behavior was also reported in studies using supports with IL without enzyme by sol-gel encapsulation by Souza *et al.*⁷, Souza *et al.*⁶¹ and Zarcula *et al.*⁹. The surface area of CBE-SIL was always larger than CBE-SC at the same loading, which would be an advantage for enzyme dispersion and substrate diffusion. It was also shown that the activity of CBE-SIL was better than that of CBE-SC, which reinforces the advantages of IL use.

Table 4. Physicochemical properties of silica supports (SC or SIL) and lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by covalent binding onto control silica (CBE-SC) or silica produced with protic ionic liquid (CBE-SIL).

Sample	Superficial Area (m ² .g ⁻¹)	Pore Volume (cm ³ .g ⁻¹)	Pore Diameter (Å)
SC	799.5	0.57	30.25
SIL	853.5	1.02	41.76
CBE-SC	349.4	0.67	42.55
CBE-SIL	371.8	0.35	46.03

In studies carried out by Yang *et al.*³ mesoporous silica SBA-15 was modified by carboxyl-functionalized ionic liquid. The prepared support was used to immobilize porcine pancreatic lipase by physical adsorption and covalent binding. After modification, the pore size, pore volume and surface area of SBA-15 decreased. The drop in these parameters could be attributed to changes of the mesopore domains and the occupation of the functional groups in the mesopore channels.^{52,62-64}

After treatment of the control support without ionic liquid (SC) with epichlorohydrin, the surface area decreased by 50% and the pore volume increased. The increased volume of the pores is possibly due to the formation of rigid spacer arms and the formation of porous channels. Similar results were observed for the surface area of silica supported with IL (CBE-SIL), but the pore volume decreased, since the spacer arms for the immobilization of lipase were retained not only at the surface but also in the interstices of the support, preventing the adsorption of nitrogen and consequently decreasing the diameter and pore volume.^{64,65}

Thermogravimetric analysis

The mass loss observed from TG curves in the range 25–1000 °C allowed the observation of enzyme degradation, water extraction from the surface and the pores, definitive carbonization, and others factor associated with condensation of silanol groups. The thermogravimetric curves for the samples (LBC, SC, SIL, CBE-SC or CBE-SIL) were divided into three regions as a function of temperature: I (25–200 °C), II (220–600 °C) and III (600–1000 °C) (Table 5).

Table 5 shows that in the area between II and III LBC underwent approximately 100% mass loss, probably due to decomposition of the enzyme organic compounds.²⁷ In Poppe *et al.*⁶⁶ water loss from free lipase in the same temperature range was also seen, and it was concluded that temperatures higher than 200 °C are required to remove tightly bound water from lipase. SC mass loss was 21% in area I and 5% in area II, different to SIL which lost 20% in area I and 10% in area II. Both lost about 1.5% in region III.

The weight loss in area I can be attributed to the presence of unreacted silanol groups from the TEOS, which are present in the silica due to incomplete sol–gel reactions. The difference in mass loss of the mass media in area II can be attributed to the presence of water in the pores, since the ionic liquid is hydrophobic and can retain water during the process of support synthesis. Additional mass loss can also be associated with the condensation of silanol groups and some loss of organic constituents (C, H, O and N) in the form of volatiles either present or formed at the beginning of organic decomposition, including decomposition of lipase.⁷

The immobilized lipase system weight loss was more pronounced in region I, at 23%, which could be associated with the desorption of water molecules from the support and the decomposition of organic and amino groups from the enzyme present on the surface.²⁷ For the immobilized lipase system onto support synthesized with ionic liquid, CBE-SIL, the highest weight loss was observed in region II, at 15%, due to the presence of enzyme on the surface and within the porous support.

Table 5. Partial mass loss of lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC), control silica (SC), silica produced with protic ionic liquid (SIL), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin on control silica (CBE-SC) or lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto silica produced with protic ionic liquid (CBE-SIL).

Samples	Temperature (°C)	Partial mass loss (%)
LBC	25–200	8.9
	200–600	83.8
	600–1000	10.4
SC	25–200	21.2
	200–600	4.9
	600–1000	1.4
SIL	25–200	20.0
	200–600	9.8
	600–1000	1.5
CBE-SC	25–200	23.4
	200–600	17.7
	600–1000	2.2
CBE-SIL	25–200	10.2
	200–600	15.1
	600–1000	1.7

The results show an increase of pores provided by the ionic liquid, generating greater lipase load in the interstices, and maintaining the water retaining layer of enzyme hydration. The best immobilization yield, ester conversion and improved operational stability were also confirmed. Poppe *et al.*⁶⁶ also describe the stability of lipases from *Rhizomucor miehei* and *Candida antarctica* type B on modified Immobead 150 supports, showing the positive effect of immobilization on the thermal stability of lipase enzymes.

Fourier transform infrared spectroscopy

The efficiency of lipase immobilization on the silica support with additives was also assessed by Fourier transform infrared spectroscopy. Typical FTIR spectra of the silica support with or without IL, as well as of the lipase from *Burkholderia cepacia* free and their immobilized forms are presented in Figure 6 for comparison purposes.

Free enzyme displayed a typical protein spectrum with bands associated with their characteristic amides (IV and V group) in the region around 695 cm^{-1} , as reported by Portaccio *et al.*⁶⁷ and Andrade *et al.*⁶⁸. The bands representing amides IV and V are also present in the spectra of CBE-SC and CBE-SIL, revealing the presence of LBC in the immobilized systems. The vibrational peaks around $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ are associated with the C–C and C–N composite vibrations of the protein chain.⁶⁸

No additional band in the spectrum was observed in any of the immobilized lipase systems, indicating that the covalent bond between the enzyme and support is of the same nature as the typical protein and support bonds. However, the peaks for CBE-SIL seem larger in the immobilized systems compared to those for the CBE-SC, especially the peak at 695 cm^{-1} .

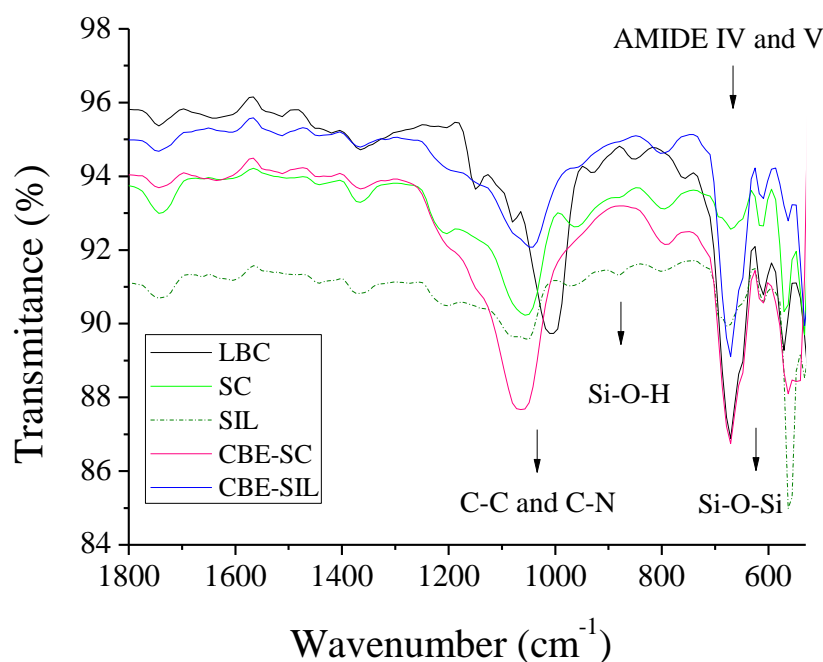


Figure 6. FTIR spectra of the lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC), control silica (SC), silica produced with protic ionic liquid (SIL), lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto silica control (CBE-SC) or lipase immobilized by covalent binding with epichlorohydrin onto silica produced with protic ionic liquid (CBE-SIL). biocatalyst.

The FTIR spectra of SC, SIL, CBE-SC and CBE-SIL showed absorption bands at around 620 cm^{-1} . These obvious peaks were characteristic vibrations of the mesoporous framework Si–O–Si.^{7,11,51,68} Si–O–H peaks at $1100\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ are also characteristic absorptions

that indicate the formation of the bonds between silica molecules as a result of polymerisation of TEOS during the formation of the silica.^{27,69}

Conclusions

Surface modified silica supports were used to immobilize the lipase from *Burkholderia cepacia* by covalent binding. The addition of protic ionic liquid (PIL) during the synthesis of the silica support by a sol-gel method resulted in an improvement in their morphological and physicochemical characteristics. Bifunctional agents are an important factor in the yield of enzyme immobilization, and when epichlorohydrin was used, immobilization yields of up to 250% for lipase immobilized onto modified silica by covalent binding were obtained. The kinetic parameters corroborate the results of the immobilization yield. Therefore, careful selection of the support and the immobilization conditions and techniques is important for the generation of stable enzyme-support composite; improvement of the operational stability; achieving favorable temperature and pH optima and kinetic parameters; and the efficient conversion of esters, 98% for colza oil. Additionally the advantage of ionic liquid modified SiO₂ as support can depend on the reaction for which the immobilized enzyme is used,

Acknowledgements

The authors thank CNPq, FAPITEC, CAPES and UNIT for their financial support of this work, and for funding research scholarships. The authors also acknowledge the University of Aveiro for characterization analyses performed in CICECO.

References

- [1] Sheldon, R. A.; Pelt, S.V.; *Chem Soc Rev.* **2013**, 42, 6223–6235.
- [2] Liese, A.; Hilterhaus, L. *Chem Soc Rev.* **2013**, 42, 6236–49.
- [3] Yang, J.; Hu, Y.; Jiang, L.; Zou, B.; Jia, R.; Huang, H. *Biochem Eng J*, **2013**, 70, 46–54.
- [4] Kapoor, M.; Gupta, MN. *Process Biochem.* **2012**, 47, 555–569.
- [5] Carvalho, N. B.; Silva, A. S.; Soares C. M. F. *Quim. Nov.* **2015**, 38, 399-409.
- [6] Cantone, S.; Ferrario, V.; Corici, L.; Ebert, C.; Fattor, D.; Spizzo, P.; Gardossi L. *Chem Soc Rev.* **2013**, 42, 6262–6276.

- [7] Souza, R. L.; Faria, E. L. P.; Figueiredo, R. T.; Freitas, L. S.; Iglesias, M.; Mattedi, S.; Zanin, G. M.; Santos, O. A. A.; Coutinho, J. A. P.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F. *Enzyme Microb Technol.* **2013**, 52, 141–50.
- [8] Scherer, R. P.; Dallago, R. L.; Penna, F. G. B.; Bertella, F.; Oliveira, D.; Oliveira, J. V.; Pergher, S. B. *Biocatal Agric Biotechnol.* **2012**, 1, 290–294.
- [9] Zarcula, C.; Coríci, L.; Croitoru, R.; Ursoiu, A.; Peter, F. *Enzyme Microb Technol.* **2010**, 65, 79–86.
- [10] Zou, B.; Song, C.; Xu, X.; Xia, J.; Huo, S.; Cui, F. *Appl Surf Sci.* **2014**, 311, 62–67.
- [11] Hu, Y.; Tang, S.; Jiang, L.; Zou, B.; Yang, J.; Huang, H. *Process Biochem.* **2012**, 47, 2291–2299.
- [12] Hara, P.; Hanefeld, U.; Kanerva, L. T. *Green. Chem.* **2009**, 11, 250–256.
- [13] Gerardin, C.; Reboul, J.; Bonne, M.; Lebeau, B. *Chem. Soc Rev.* **2013**, 42:4217–4255.
- [14] Naushad, M.; Othman, Z. A. A. L.; Khan, A. B.; Ali, M. *Int. J Biol. Macromol.* **2012**, 51, 555–560.
- [15] Karout, A.; Pierre, A. C. *J. Non-Cryst. Solids.* **2007**, 353, 2900–2909.
- [16] Alvarez, V. H.; Mattedi, S.; Martin-Pastor, M.; Aznar, M.; Iglesias, M. *Fluid Phase Equilibr.* **2010**, 299, 42–50.
- [17] Barbosa, A. S.; Silva, M. A. O.; Carvalho, N. B.; Mattedi, S.; Inglesias, M. A.; Fricks, A. T.; Lima, A. S.; Franceschi, E.; Soares, C. M. F. *Quím. Nova.* **2014**, 37, 969–976.
- [18] Oliveira, M. V. S.; Ros, P. C. M.; Mattedi, S.; Castro, H. F.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S. *Acta Sci. Technol.* **2014**, 36, 445–451.
- [19] Brady, D.; Jordaan *J. Biotechnol. Lett.* **2009**, 31, 1639–1650.
- [20] Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska B. *Adsorption.* **2014**, 20, 801–821.
- [21] Zaidan, U. H.; Rahman, M. B. A.; Othman, S. S.; Basr, M.; Abdulmalek, E.; Rahman R.; Salleh A. B. *Food Chem.* **2012**, 31, 199–205.

- [22] Zhou, Z.; Hartmann M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 3894–3912.
- [23] Hartmann, M.; Kostrov, X. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6277–6289.
- [24] Talbert, J. N.; Goddard J. M. *Colloids Surf. B.* **2012**, 93:, 8–19.
- [25] Abdulla, R.; Ravindra P. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2013**, 44, 545–551.
- [26] Mendes, A. A.; Castro, H. F.; Giordano, R. L. C. *Quím Nova.* **2013**;, 36, 245–251.
- [27] Soares, C. M. F.; Santos, O. A.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, 113, 307–319.
- [28] Soares, C. M. F.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, 77, 745–757.
- [29] Santos, J. C.; Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Castro, H. F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, 52, :49–57.
- [30] Cabrera-Padilla, R.Y.; Albuquerque, M.; Figueiredo, R. T.; Fricks, A.T.; Francheschi, E.; Álvaro, S. L.; Onélia, A. A. S.; Silva, D. P.; Soares, C. M. F. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, 1, :2–15.
- [31] Carvalho, N. B.; Barbosa, J. M. P.; Oliveira, M. V. S.; Fricks, A.T.; Álvaro, S. L.; Soares, C. M.F. *Quím. Nova.* **2013**, 36, 52–58.
- [32] Forde, J.; Vakuro, A.; Gibson, T. D.; Millner, P.; Whelehan, M.; Marison, I. W.; Ofagain., C. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 66, 203–209.
- [33] Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisan, J. *M. Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 58, 486-493.
- [34] Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. *Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19, 279-286.
- [35] Minovska, V.; Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S. *J. Serb. Chem. Soc.* **2005**, 70, 609–624.
- [36] Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. *Biotechnol. Adv.* **2012**, 30, 489–511.

- [37] Paula, A.V.; Urioste, D.; Santos, J. C.; De Castro, H. F. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, 82, 281–288.
- [38] Betancor, L.; Lopez-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Mateo, C. *Enzyme Microb. Technol.* 2006, 39, 877–882.
- [39] Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Biotechniques.* **2004**, 37, 790-802.
- [40] Monsan, P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1978**, 3, 371-384.
- [41] Barbosa, O.; Torres, R.; Ortiz, C.; Fernandes-Lafuente, R. *Process Biochem.* **2012**, 47, 1220–1227.
- [42] Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R. C. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, :2885–904.
- [43] Porath, J.; Fornstedt, N. *J. Chromatogr.* **1970**, 51, 489–497.
- [44] Dhake, K. P.; Karoyo, A. H.; Mohamed, M. H.; Wilson, L. D.; Bhanage, B. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, 87, 105–112.
- [45] Yigitoglu, M.; Temoc, Z. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 66, 130–135.
- [46] Da Ros, P. C.M.; Silva, G. A.M.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Castro, H. F. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 508–5516.
- [47] Karimpil, J. J.; Melo, J. S. D.; Souza, S. F. J. *Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, 71, 113–118.
- [48] Gog, A.; Roman, M.; Tos, M.; Paizs, C.; Irimie, F. D. *Renew. Energy* **2012**, 39, 10–16.
- [49] Al-Zuhair, S.; Ling, F. W.; Jun, L. S. *Process Biochem.* **2007**, 42, 951–60.
- [50] Park, J.; Kima, M.; Park, J.; Lee, D.; Lee, K.; MIN, J. *Process Biochem.* **2010**, 45, 259–263.
- [51] Zou, B.; Hu, Y.; Yu, D. H.; Xia, J. J.; Tang, S. S.; Liu, W.M.; Huang, H. *Biochem. Eng. J.* **2010**, 53, 150–153.

- [52] Zou, B.; Hu, Y.; Yu, D. H.; Jiang, L.; Liu, W. M.; Song, P. *Colloids Surf. B* **2011**, 88, 93–99.
- [53] Lam, M. K.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28, 500–18.
- [54] Murugesan, A.; Umarani, C.; Chinnusamy, T. R.; Krishnan, M.; Subramanian, R.; Neduzchezain, N. *Renewable Sustainable Energ. Rev.* **2009**, 13, 825–34.
- [55] Guldhe, A.; Singh, B.; Mutanda, T.; Permaul, K.; Bux, F. *Renew Sust. Energ. Rev.* **2015**, 41, 1447–1464.,
- [56] Shahid, E. M.; Jamal, Y. *Renew Sust. Energ. Rev.* **2011**, 15, 4732–4745
- [57] Singh, S. P.; Singh, D. *Renew Sust. Energ. Rev.* **2010**, 14, 200–16.
- [58] Dennis, Y. C.; Xuan W. L.; Leung, M. K. H. *App. Energ.* **2010**, 87, 1083–95.
- [59] ANVISA–Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de **1999**.
- [60] Salis, A.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Polaina, J, MacCabe, A.P. (Eds.), **2007**. *Industrial Enzymes: Structure Function and Applications*. Springer. p. 315
- [61] Souza, R. L.; Resende, W. C.; Barao, C. E.; Zanin, G. M.; Castro, H. F. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, 84, 152–159.
- [62] Hu, Z.; Hu, Y.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H. *Biochem. Eng. J.* **2010**, 53, 150–153.
- [63] Zhao, H. H.; Yuy. N. Y.; Ding, Y.; Tan, R.; Liu, C.; Yin, D. H.; Qiu, H. Y. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, 136, 10–17.
- [64] Abdullah, A. Z.; Sulaiman, N. S.; Kamaruddin, A. H. *Biochem. Eng. J* **2009**, 44, 263–270.
- [65] Lu, Y.; Guo, Y.; Wang, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Guo, Y.; Zhang, Z.; Lu, G. *Microporous and Mesoporous Mater.* **2008**, 114, 507–510.
- [66] Poppe JK, Costa AP, Brasil MC, Rodrigues RC. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, 94, 57–62.

[67] Portaccio, M.; Ventura, B. D.; Mita, D. G.; Manolova, N.; Stoilova, O.; Rashkov, I.; Lepore, M. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2011**, 57, 204–211.

[68] Andrade, L.H.; Rebelo, L. P.; Netto, C. G. C. M, Toma HR. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 66, 55–62.

[69] Anuar, S.T.; Zhao, Y.; Mogo, S. M.; Curtis, J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, 92, 62–70.

ARTIGO III

Studies on reaction parameters influence on synthesis of ethyl esters using lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized onto silica modified with ionic liquid protic

Nayara Bezerra Carvalho^a, Bruna Targanski Vidal^a, Aroni Campos Professor^a, Gabriela Vieira Silva Simões^a, Matheus Mendonça Pereira^b, Lisiane Freitas Santos^c, Silvana Mattedi^d, Alvaro Silva Lima^a, Cleide Mara Faria Soares^{a*}

^a Institute of Technology and Research, University Tiradentes, Aracaju, Brazil.

^b Department of Chemistry, University of Aveiro, Aveiro, Portugal,

^c Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, São Cristovão, Brazil,

^d Department of Chemical Engineering, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil,

* Corresponding author. Tel.: +55 3218 2190.

E-mail address: cleide.soares@pq.cnpq.br

Abstract: Synergistic effects were observed in the use of silica modified with ionic liquid to improve the efficiency of the lipase immobilized by different methods. These immobilized biocatalysts were used for the transesterification of sunflower oil to ethyl esters. Immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC) was applied to silica modified with a protic ionic liquid, N-methylmonoethanolamine pentanoate (MS) and silica control (SC) by the physical adsorption or covalente binding method. The reaction parameters of transesterification were evaluated: temperature (40, 50 and 60°C), loading (10, 15 and 20% w.v⁻¹) and the molar ratio of oil: ethanol (1: 7, 1:10 and 1:13), for 96 h at 80 rpm using full factorial experimental design (2³ with 3 three central points). Physicochemical characterization of the supports and immobilized biocatalysts were performed by nitrogen adsorption (BET), Fourier transform infrared (FTIR), thermal analysis (TG) and scanning electron microscopy (SEM). The total conversion of ethyl esters produced by LBC immobilized onto SC by physical adsorption was 85% at 72 h, while the same concentration using other method, covalent binding, was 96% at 72 h. For both methods of immobilization the half-life was more than double when the biocatalyst immobilized on modified silica. It was shown that the introduction of IL during production of support influenced significantly the changing the structure and surface properties of silica and the catalytic behavior of LBC, synergistic effects was observed for the transesterification reactions of sunflower oil to biodiesel. Lipase immobilized onto silica by the sol-gel technique and modified with ionic liquid protic as additive can play an important role in esters production and within the experimental range studied the results model give good agreement with the experimental data. Correspondingly, these data show that a modification of silica with ionic liquid protic combined with enzyme presented positive synergistic effects for lipase immobilization.

Keywords: silica modified; ionic liquid; immobilized lipase; transesterification; esters ethyl; experimental design.

1. Introduction

Lipases are one of the more commonly used enzymes in biotechnology for the biotransformation reactions of vegetable oils, such as esters by transesterification. Different vegetable oils are used in biocatalysis, such as palm oil, cotton, soybean, canola, castor oil, pine nuts, sunflower. Among these, the sunflower stands out because it is a culture with wide adaptability, has increased tolerance to drought, lower incidence of pests and diseases, and nutrient cycling. In Brazil, the sunflower can be grown in almost all the territory. In the northeast, specifically in the north of Bahia and the southern state of Sergipe, according to Embrapa Tabuleiros Coastal located one of the highest yields in Brazil, with average yield of sunflower seed in agricultural year 1078-3105 kg / ha, exceeding in many cases the national average productivity, which is around 1.500 kg / ha (Carvalho *et al.* 2014).

Enzyme stabilization is thus a decisive step from an economic perspective and an alternative way to achieve good performance is the immobilization of lipase onto supports modified with different substances, such as ionic liquid ILs (Cabrera *et al.*, 2014, Hu *et al.*, 2012).

According to the literature, selection of the appropriate support and some modifications can enhance the global performance of the process, due lipase becomes more active if the interactions between them and their support stabilize their open form which generates a higher activity (Carvalho *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2015; Jesionowski *et al.*, 2014). Because, the lipase can exist in two forms: an open, active form in which the lid displaces and allows substrate access to the catalytic site and a closed, inactive form in which the lid shuts, thereby hiding the catalytic site (Fernandez-Lorente *et al.*, 2001; Verger, 1997).

The ionic liquid are compounds formed mostly of an organic cation and an inorganic anion or organic and classified in aprotic and protic. Recently, aprotic ionic liquid has been applied as an additive in immobilization protocol, during the process of lipase immobilization treatment of commercial support for enzyme immobilization, such Zou *et al.* (2014) studied different imidazole-based ionic liquid precursors grafted onto the surface of mesoporous silica SBA-15 for immobilization of porcine pancreas lipase by physical adsorption. Hu *et al.* (2012) modified mesoporous silica SBA-15 with imidazole-based ionic liquids with various functional groups for immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* (LBC) by physical adsorption and the results revealed that modification of support increased pore structure, strengthened the

enzyme-support surface interactions and the properties of immobilized enzyme, obtaining synergistic effects in the complex enzyme and support.

On the other hand protic ionic liquids (PIL) are produced through proton transfer from a Brønsted acid to a Brønsted base and are interesting because they have a highly mobile proton and cations with different alkyl chains, they are cheap, and synthesis is simple, with very low toxicity, suggesting biocompatibility with lipases (Alvarez *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2004). And so far no studies have used lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized onto silica modified with PIL by the physical adsorption or covalent binding method for the production of ethyl ester (Zou *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2012).

Transesterification reaction can include the presence of an acid, a base or an enzyme as catalysts. These studies have shown that the main factors affecting the yields produced by these reactions are: oil:alcohol molar ratio, type of alcohol, temperature, quantity of water, oil or fat purity, support, immobilization method and enzymes (Sagiroglu *et al.*, 2008). Due synergistic effect the use response surface methodology (RSM), for analysis the influence of several variables, has been widely applied to the transesterification reaction (Yu *et al.*, 2013; Da Ros 2012; Zarcuła *et al.*, 2010).

Besides, the morphological and physical-chemical characterization of silica and biocatalyst immobilized by different techniques are tools relevant and can combine of the characteristic from structure with catalytic efficient in according literature (Souza *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2010). The objective of this study was the chemical modification of silica with protic ionic liquid and use it as for to immobilize from *Burkholderia cepacia* by the physical adsorption or covalent binding method and evaluation of the synergistic effects of the variables temperature, molar ratio and enzyme loading in the transesterification reaction through full factorial experimental design.

2. Materials and methods

2.1. Enzyme and Chemicals

Lipase from *Burkholderia cepacia* was purchased from Sigma Aldrich (Japan, 2200 U.g⁻¹). The silane precursor tetraethoxysilane (TEOS) was supplied by Across Organic (NJ, USA). Tetraethoxysilane (TEOS) was acquired from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). Epichlorohydrin, hydrochloric acid and polyethylene glycol (PEG molecular weight 1.500) were supplied by Reagen (Brazil). Water was purified by reverse osmosis and deionized through a Milli-Q four-cartridge organic-free water purification system. Sunflower oil was acquired in the market place of Aracaju - SE Brazil. Other chemicals were of analytical grade and used as received.

2.2. Preparation of Silica by Sol-Gel Technique

The methodology used was that previously established by Souza *et al.* (2013) with some modifications.

The technique was divided in four main stages, which are described below:

Step 1: Tetraethylorthosilicate (36 mL) was dissolved in absolute ethanol (30 mL) in an inert atmosphere of nitrogen and slowly added over it hydrochloric acid dissolved in ultra pure water, 0.22 and 5 mL, respectively (pre-solution hydrolyzing). Then the temperature was maintained at 35 °C and left under stirring for 90 min, obtaining the silica.

Step 2: For silica modified with ionic liquid (N-methylmonoethanolamine pentanoate) was added 1% (w.v⁻¹).

MS), if not added to the ionic liquid support was named as silica control (SC).

Step 3: for obtation completely hydrolysis of silica was add them immediately ammonium hydroxide (1 mL) dissolved in ethanol (6 mL), and then the mixture was allowed to stand for 24 h to allow complete polycondensation.

Step 4: Following this period, the silica was washed with hexane and acetone, vacuum dried, kept in a desiccator for 72 h and sieved to obtain a particle size of 42-60 mesh.

Two supports were obtained: one without protic ionic liquid, denominated silica control (SC) modified silica with protic ionic liquid (MS).

2.3. Immobilization by Physical Adsorption (PA)

The physical adsorption procedure (PA) was performed according to Soares *et al.* 2004 from contact of the aqueous enzyme solution with the support obtained by sol-gel techniques (SC and MS) in the mass ratio of 0.3:1 (lipase:silica) in organic medium (hexane) over a period 3h, 50 rpm. After this period, the solution was kept 4 °C for 24 h. The immobilized lipase has gone through a washing process with hexane and was recovered by vacuum filtration and the immobilized biocatalyst was kept 24 h in a desiccator. The biocatalysts immobilized by physical adsorption (PA-SC or PA-MS) were used in the standard reaction for evaluation of performance and subsequently in the transesterification reaction for obtaining ethyl esters.

2.4. Immobilization by Covalent Binding (CB)

The activation of SC or MS particles was carried out with epichlorohydrin at 2.5% (w.v⁻¹) pH 7.0 for 1 h at room temperature, followed by washings with distilled water according Carvalho *et al.* (2016). Supports activated was soaked into hexane under stirring (100 rpm) for 1 h at 25 °C. Then, excess of hexane was removed and lipase was added at a ratio of 1:4 gram of enzyme per gram of support. PEG-1500 (5 mg.g⁻¹) was added together with the enzyme solution at a fixed amount (100 µl.g⁻¹ of support). Lipase-support system was maintained in contact for 16 h at 4 °C under static conditions. The immobilized lipase derivative were filtered and thoroughly rinsed with hexane. The biocatalysts immobilized by covalent binding (CB-SC or CB-MS) were used in the standard reaction for evaluation of performance and subsequently in the transesterification reaction for obtaining ethyl esters.

2.5. Enzymatic Activity

2.5.1. Hydrolysis reaction

Enzymatic activities of free or immobilized lipase were assayed using the olive oil emulsion method according to Soares *et al.* (2004). One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme liberating 1µmol of free fatty acid per min (µmol.min⁻¹). Analyses of hydrolytic activities were carried out on the lipase loading solution and immobilized preparations to determine the total activity and yield immobilization, Y_a (%), according to Equation 1:

$$Y_a (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (1)$$

in which U_s corresponds to the total enzymatic activity recovered on the support and U_0 represents the enzyme units offered for immobilization.

2.5.2. Transesterification reaction

Transesterification reactions catalysed by the lipase from *Burkholderia cepacia* were performed in a solvent-free system using the conditions proposed by Freitas *et al.* (2009). The transesterification reactions were carried out in batch reactors with a capacity of 25 mL, which were submerged in a thermostatic bath to keep each mixture at constant temperature and under agitation. All experiments were composed by 5 g of substrate consisting of sunflower oil and anhydrous ethanol without the addition of solvents.

The experiments were performed according to full factorial experimental design, 2^3 with three replicates at central levels. The experimental variables were temperature, ethanol to sunflower oil molar ratio and enzyme loading as described in the Table 1, having as response variable the ethyl esters conversion. The data obtained were analyzed using Statistica software version 8.0 to verify the independent variables effects on the response assuming levels of $p < 0.05$ as the statistical significance and response surface methodology (RSM).

Table 1: Factor levels used according to the full factorial experimental design, 2^3 with three replicates at central levels

Variable	Symbols	Levels		
Temperature (°C)	X_1	40	50	60
Molar ratio (sunflower oil to ethanol)	X_2	1:7	1:10	1:13
Enzyme loading (w.w ⁻¹ %)	X_3	10	15	20

2.5.3. Characterization of transesterification products

To determine esters conversion (%), the characterization of ethyl esters was done by GC gas chromatograph (Shimadzu 2010) equipped with a Carbovax (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm) column. The parameters used for chromatography are shown in Table 2.

Table 2: Parameters used in the chromatography

Chromatograph used	Shimadzu 2010 instrument
Detector	FID (Flame Ionization Detector)
Column	Carbovax (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm)
Temperature of the detector	250 °C
Oven temperature	100-260 °C
Heating rate	10 °C.min ⁻¹
Carrier gas	Hydrogen

The analyzed sample was prepared by mixing of biodiesel previously purified with standard solution. An aliquot of the sample was then injected in to the chromatograph with a 10 mL glass needle. The yield calculation in esters was carried out based on the mass and areas under the peaks corresponding to the ethyl and methyl esters, and on the internal standard, using Equation (2). Conversion analyses were performed in duplicate.

$$Conversion(\%) = \frac{(A_E - A_{IS})}{A_{IS}} \times \frac{(C_{IS})}{C_E} \times 100 \quad (2)$$

where: A_E = sum of the peak areas corresponding to the esters in the sample; A_{IS} = peak area corresponding to the internal standard; C_{IS} = internal standard concentration; C_E = sample concentration.

2.6. Reusability of Immobilized Lipase

The reusability or operational stability in the transesterification reaction by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by physical adsorption or covalent binding on SC or MS was carried out to the run of the experimental design that had a higher conversion to ethyl esters

at 72h. Immobilized lipase was washed with hexane once and reused for the next cycle. The initial conversion was defined as 100%.

The half-life ($t_{1/2}$) for immobilized were calculated using Equations 3 and 4, respectively, according to the literature (Da Ros *et al.*, 2012, Cabrera-Padilla *et al.*, 2012).

$$A = A_0 \times \exp(-k_d \times t) \quad (3)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{-k_d} \quad (4)$$

where A is the residual activity after reaction (U), A_0 is the initial enzyme activity (U), k_d is the inactivation constant (h^{-1}), and $t_{1/2}$ is the half-life (h).

2.7. Morphological and Physicochemical Characterization

The surface area of silica (SC and MS) and immobilized biocatalysts (PA-SC, PA-MS, CB-SC or CB-MS) were measured by physical adsorption, with nitrogen as the adsorbate. The samples were previously subjected to thermal treatment at 120 °C for 48 h, to eliminate any water existing within the pores of the solids, and degassed to below 50 mmHg at room temperature; analyses were performed at 77 K.

The surface area ($m^2.g^{-1}$) was calculated by the Brunauer, Emmett, and Teller (B.E.T.) method. Pore volume ($cm^3.g^{-1}$), diameter (\AA) and area distributions based on BJH calculation were evaluated by the B.E.T. apparatus software (Model NOVA – Surface Area & Pore Size Analyser, Quantschome Instruments).

Thermogravimetric (TG) curves of LBC, SC, MS, PA-SC, PA-MS, CB-SC and CB-MS were obtained using a TG, Perkin Elmer Pyris1 apparatus, under a nitrogen atmosphere that started from room temperature and went up to 1000 °C, increasing at a heating rate of 10 °C.min⁻¹. The thermogram was divided into three regions as a function of temperature and the percentage of the mass loss was calculated using Equation 5.

$$Mass\ Loss\ (\%) = \left(\frac{w_f - w_i}{w_f} \right) \times 100 \quad (5)$$

in which w_i and w_f are the initial and final weight of samples, respectively.

Scanning electron microscopy (model Hitachi S4100i, accelerating potential of 30 kV to 500 V and 15 A resolution) was also used to characterise the surface of the samples. The samples of LBC, SC, MS, PA-SC, PA-MS, CB-SC and CB-MS were submitted to FTIR analysis (Perkin Elmer). Spectra were obtained in the wavelength range from 500 to 4000 cm^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Yield of Immobilization

There aren't studies about using immobilization processes onto modified silica obtained by the sol-gel technique that can explain synergistic effects as such in the sol-gel process onto obtained silica, the gelation characteristics and the structure of the hybrid sol-gel support formed. And still also achieve the decrease of diffusion limitation because of the availability of enzyme on surface modified silica.

The synergistic effects of lipase and silica in this were observed in standard hydrolysis reaction, transesterification reaction, morphological and physicochemical characterized (Carvalho *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2004; Cabrera-Padilla *et al.*, 2012). The results show that the influence of ionic liquid onto support production was a positive one regarding the immobilization of lipase by physical adsorption with yield from 33 to 64%, practically double the yield of immobilization compared with the silica support control. According Carvalho *et al.*, (2016), for immobilization by covalent binding yield of immobilization on modified silica increase the yield immobilization was only 1.25 times higher when using the modified support, according, as shown below (Table 3).

It can be seen that after support modification with ionic liquid yield increased for all immobilization techniques. We suggest that according to Cui *et al.* (2015) overcome limitation of the immobilization, researchers have adopted methods to modify the support surface with additives to reduce the possibility of the enzyme denaturation during the immobilization (Zhu *et al.*, 2011; Palomo *et al.*, 2003).

This difference is probably due to strong hydrophobic adsorption of the enzyme on the surface and in the pores of the support, since the support produced with ionic liquid has a greater surface area, pore volume and diameter, as discussed later. According Liese and Hilterhaus (2013) the immobilization of the lipase to the porous solid surface can there is only a certain penetration. Nevertheless, a complete and uniform distribution of the immobilized enzyme throughout the particle is only beneficial if catalysis can occur throughout the bead volume, preventing the mass transport limitations. Especially in this work, the effect that the calculated activity of an immobilized enzyme onto porous support is surprising, as shown in Table 3.

Table 3: Comparison of yield immobilization of the lipase for the techniques, physical adsorption and covalent bond, in support control or modified.

Samples	Yield Immobilization (%)	Reference
PA - SC	33	This study
PA-MS	64	This study
CB-SC	200	Carvalho <i>et al.</i> , (2016)
CB-MS	250	Carvalho <i>et al.</i> , (2016)

Cabrera-Padilla *et al.* (2014) used the ionic liquids as additives to immobilize lipase from a new source of *Bacillus* sp. (ITP-001) by the physical adsorption method supporting green poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) in order to evaluate the influence of the cationic core ([C₄mpy]Cl, [C₄min]Cl), of anions ([C₄min]Cl, [C₄min]N(CN)₂, [C₄min]Tf₂N) and the cation chain length ([C₂min]Tf₂N, [C₄min]Tf₂N)) in the immobilization process. Observed that the total activity recovery yield (Y_a) for the immobilized biocatalysts employing IL as additives always resulted in higher values compared with the control. The most efficient was using the more hydrophobic ionic liquid [C₄min]Tf₂N, which represents a 2-fold greater increase yield of enzymatic activity similar the obtained in this studies for silica modified with IL for immobilized lipase. However, in this study the IL was used only in the production of support, without contact with the lipase, a fact that eliminates the possibility of super activation of the lipase by IL.

The effect is not always positive, however. For example, in the study by Hu *et al.* (2012) the efficiency of immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* by physical adsorption onto silica SBA-15 modified with aprotic ionic liquid was 69%, but for a support without ionic

liquid the efficiency of immobilization was 87% for the triacetin hydrolysis method. This effect was possibly to the result of the significant change in structural parameters, such as the reduction of the area and pore volume of the SBA after modification with ionic liquid or type ionic liquid, and reduction of the load of the immobilized enzyme support.

3.2. Ethyl Ester Conversion

A full factorial experimental design with two levels, three variables and three replicates at central levels was created to determine the experimental conditions that maximize the synthesis of ethyl esters was dependent variable and to analyze the significant effects of the variables. The ethyl esters conversion obtained in the transesterification reaction of sunflower oil using immobilized biocatalysts are shown in Table 4. However, all conversion results for each aliquot analyzed in the run for 96 h are shown in the support information of this article.

The first step in the process of searching for optimal conditions to identify the significant variables that increase the conversion of ethyl esters until 96 h. Table 4 shows the highest yield by lipase immobilized by physical adsorption onto SC and MS was 79% (72 h) and 85% (96 h), respectively, was achieved at low temperature (40 °C), enzyme concentration (20%) and oil: alcohol ratio (1:7). Under the same conditions was achieved approximately 96% in 72 h of transesterification reactions using LBC immobilized by covalent binding onto silica modified with IL.

The temperature, molar ratio and amount of enzyme are independent variables for the synthesis of esters. Based on previous reports using lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on various supports for the transesterification of triglyceride to biodiesel the variables for optimization and the corresponding ranges were temperature from 35 to 60 °C, the molar ratio of oil:ethanol from 1:6 (Tran *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2008; Nouredini *et al.*, 2005). It may be noted that the greatest conversions were obtained for these biocatalysts immobilized on modified support in the molar ratio 1: 7 temperature 40 °C, and enzyme loading of 20% (w.w⁻¹). These results clearly indicate a very interesting synergy for this particular system, because the conversion by the lipase immobilized by physical adsorption or covalent binding onto modified support is higher than the ethyl esters converted by the biocatalysts immobilized onto control silica. According Vasconcellos *et al.* (2012) therefore a possible explanation for the synergistic effect observed for immobilized complex compared to the other control supports

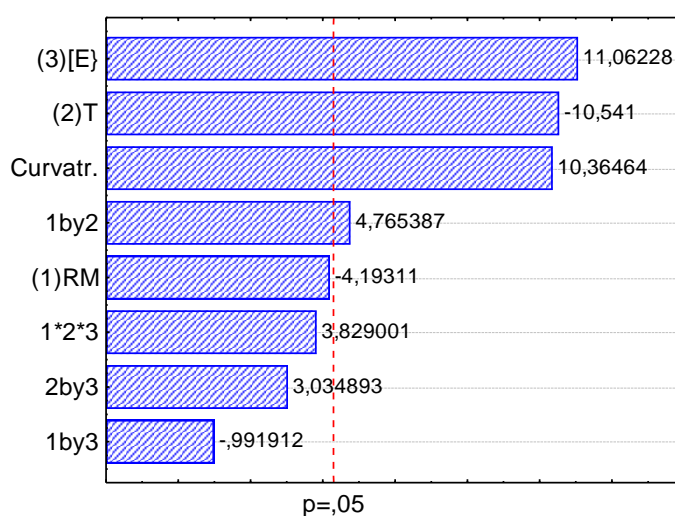
is probably related to the ability of the enzyme to maintain the functionality of its catalytic site after the immobilization, specially the stabilization of its secondary structure.

Three hypotheses also were proposed by Cui *et al.* (2015) the lipase is immobilized by covalente binding onto the hydrophobic support, the hydrophobic environment could induce the opening of the lid structure, thus activating the lipase by interaction activation (1); when the lipase is immobilized onto modified support, the secondary amino group could immobilize lipase by ionic exchange (2) and finally when the lipase is immobilized onto the biocompatible support, the lipase conformation is almost entirely maintained, which accelerates its catalytic efficiency (3). Hence we concluded that the hypothesis 1 and 3 applies to present work, use of the hydrophobic support modified with an ionic hydrophobic liquid increasing the efficiency of the biocatalyst in the immobilization due this synergistic effect.

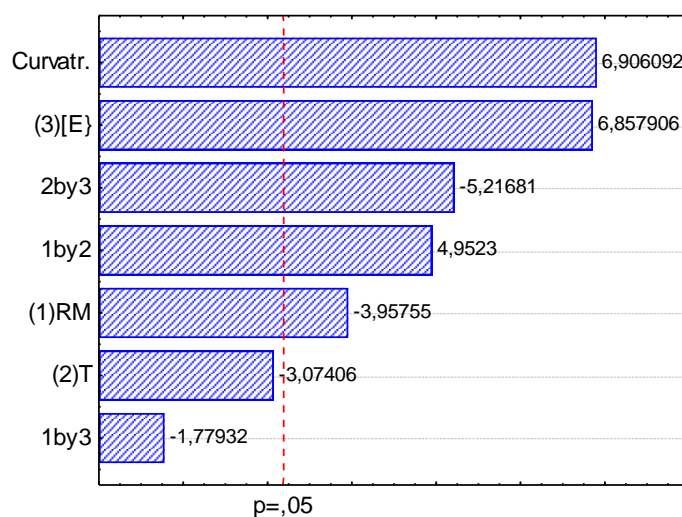
Table 4: The experimental factorial design of experiments and the corresponding conversions in the transesterification reactions.

Run	Variable			Conversion (%)			
	Temperature (°C)	Molar ratio (oil:ethanol)	Enzyme loading (%)	PA -SC	PA -MS	CB-SC	CB-MS
1	-1 (40)	-1 (1:7)	-1 (10)	41.91 ± 3.51 (96h)	64.45 ± 1.77 (96h)	73.89 ± 2.29 (96h)	72.29 ± 3.89 (96h)
2	1 (60)	-1 (1:7)	-1 (10)	13.27 ± 2.97 (96h)	57.84 ± 2.44 (96h)	62.01 ± 2.24 (96h)	77.96 ± 2.42 (96h)
3	-1 (40)	1 (1:13)	-1 (10)	9.08 ± 1.64 (96h)	41.25 ± 2.08 (96h)	43.91 ± 3.91 (72h)	52.27 ± 3.32 (96h)
4	1 (60)	1 (1:13)	-1 (10)	22.17 ± 1.07 (96h)	37.63 ± 2.02 (96h)	36.90 ± 3.33 (96h)	61.33 ± 1.03 (96h)
5	-1 (40)	-1 (1:7)	1 (20)	79.77 ± 1.57 (96h)	85.36 ± 3.53 (72h)	78.35 ± 2.14 (72h)	95.85 ± 2.56 (72h)
6	1 (60)	-1 (1:7)	1 (20)	77.07 ± 1.73 (96h)	62.96 ± 1.90 (96h)	72.86 ± 1.82 (72h)	74.88 ± 2.74 (96h)
7	-1 (40)	1 (1:13)	1 (20)	8.74 ± 2.87 (96h)	59.25 ± 1.80 (96h)	80.77 ± 1.45 (72h)	58.17 ± 2.54 (72h)
8	1 (60)	1 (1:13)	1 (20)	11.01 ± 2.69 (96h)	64.70 ± 2.90 (96h)	51.29 ± 1.66 (72h)	66.03 ± 2.37 (72h)
9	0 (50)	0 (1:10)	0 (15)	30.97 ± 2.15 (96h)	73.76 ± 2.97 (96h)	67.1 ± 1.28 (96h)	69.12 ± 2.82 (96h)
10	0 (50)	0 (1:10)	0 (15)	33.50 ± 2.06 (96h)	73.64 ± 1.01 (96h)	66.8 ± 1.86 (96h)	67.49 ± 2.94 (96h)
11	0 (50)	0 (1:10)	0 (15)	34.11 ± 3.10 (96h)	77.61 ± 3.42 (96h)	65.2 ± 3.40 (96h)	68.93 ± 2.51 (96h)

In selected independent variables using PA-MS in transesterification reactions, the most significant in the level of 5% were enzyme loading (3), temperature (2), curvature and interactions between temperature and molar ratio, are significant. For covalent immobilization using MS enzyme loading, molar ratio (1), interactions between 2 and 3, and 1 and 2 are significant and curvature. These significant values ($p < 0.05$) can be better seen in the Pareto diagram in Figure 1. However, the variable molar ratio and temperature have no significant influence on conversion to ethyl esters for the PA and LC, respectively.



(a)



(b)

Figure. 1 Pareto chart with 5% level of significance and linear regression coefficient of 0.99:

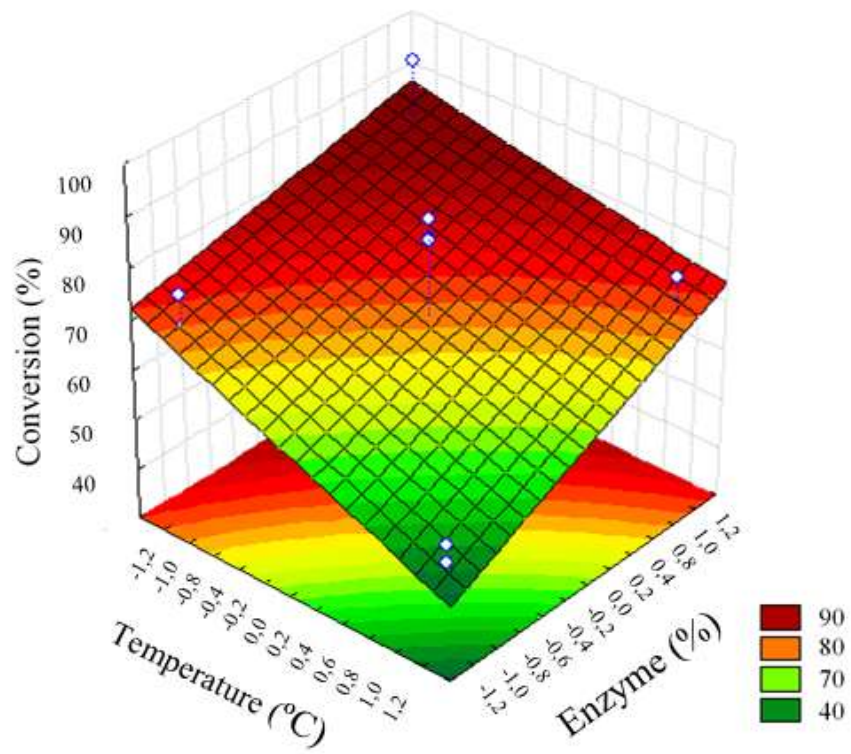
a) PA-MS and b) CB-MS.

The response surface methodology (RSM) was used as an approach for determining the region where the yield was maximized for the oil tested, nevertheless, no optimal conditions were observed (Figure 2).

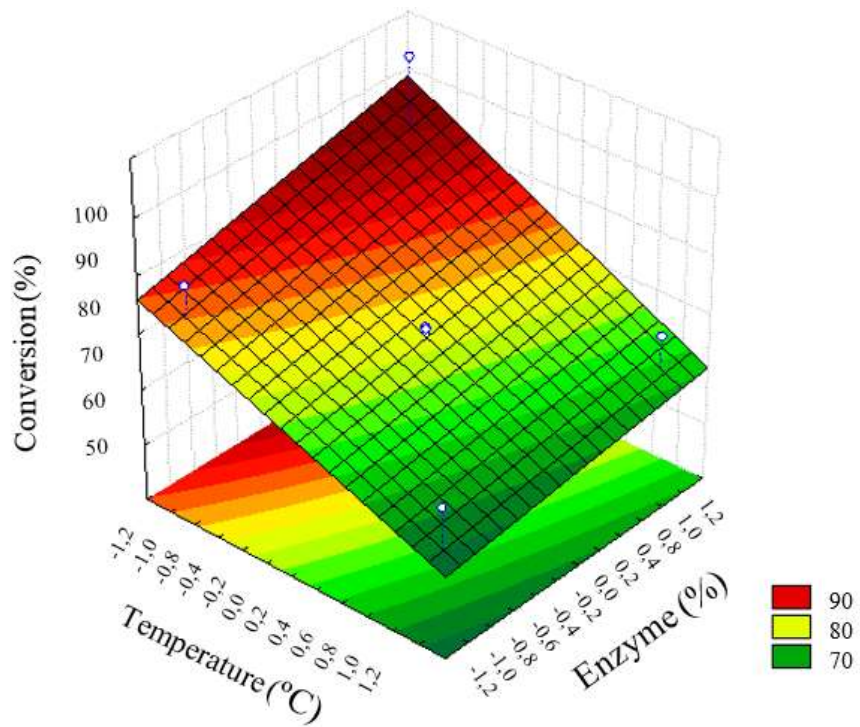
For the immobilized lipase by physical adsorption the conversion increases by 20%, on average, when the enzyme loading from a higher level (10) to a lower level (20), and 44% when molar ratio from a higher level (1:13) to a lower level (1:7). For the lipase immobilized by covalent binding onto MS the reaction yield decreases by 43%, on average, when enzyme concentration goes from higher a level (20%) to a lower level (7%) and when the molar ratio goes from a higher level (1:13) to a lower level (1:7). Overall, the final biodiesel yield and the reaction time of lipase immobilized onto modified silica were both substantially optimized due to the positive synergy provided by modification of support and immobilization method.

In this study the greater the concentration of enzymes, the higher the reaction yield, therefore, enzyme concentration had a positive effect, showing a higher yield when a greater quantity is of 20% of enzyme. Studies realized by Ribeiro *et al.* (2012) or had similar results for enzymatic transesterification with higher loading lipase immobilized for transesterification of coconut oil with 80.5% conversion. Results obtained with higher loading enzymatic were also obtained by Yu *et al.* (2013) and Oliveira *et al.* (2014).

Although the excess alcohol being a factor inhibiting the enzymatic activity and change the diffusion limitation. In this study the enzymes were not influenced for this variable. Enzymes when present in the immobilized form mostly a higher reaction rate when an increase in temperature occurs, therefore are protected from thermal effects and the collision chance between enzyme and substrate molecules increased, which might help to form enzyme and substrate complexes and then led to the increase of enzyme activity (Carvalho *et al.*, 2014 Oliveira *et al.*, 2014; Da Ros *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012).



(a)



(b)

Figure 2: Response surface for biodiesel conversion due to loading enzyme and temperature by physical adsorption (a) and covalent binding (b) onto modified silica

3.2.1 Reusability of Immobilized Lipase

Reusability is the most important quality for enzymes when applied in industry (Cui *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2015). The initial conversion was defined as 100% of conversion to ethyl esters of sunflower (40°C, molar ratio 1:7 and enzyme loading 20% w.w⁻¹) the reusability of immobilized lipase after washing with dionized water is shown in Table 5. After three repeated uses, immobilized lipase by physical adsorption onto SC recycled by washing decreases the conversion of esters to below 50%. While immobilized onto MS this value was reached only on the 6th cycle.

Table 5: Reusability of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized onto SC or MS by physical adsorption or covalent binding in the transesterification reaction.

Number of cycle	Relative Conversion (%)			
	PA-SC	PA-MS	CB-SC	CB-MS
0	100	100	100	100
1	71.59	88.97	85.46	91.68
2	54.17	82.31	72.52	88.94
3	49.48	81.55	68.81	83.62
4	21.92	76.47	55.42	82.97
5	22.61	66.5	46.88	69.05
6	4.87	59.2	21.69	66.16
7		43.9		56.75
8		18.5		53.68
9				51.62
10				44.35
11				37.53

In evaluating biocatalyst immobilized by covalent binding it is possible to observe two cycles to achieve 50% conversion to esters by immobilized lipase catalyst SC compared to immobilization by physical adsorption. The maximum reuse of immobilized biocatalyst was achieved by covalent binding on modified silica, with 9 cycles up to 50%.

Finally, it is possible that the support modified presents greater porosity and could protect lipase against inactivation, since immobilized lipase by covalent binding has been shown to improve enzymatic activity and stability.

The decrease in conversion after recycling can be partially attributed to the loss of lipase-support or change in the enzyme conformation during recycles. In others works, lipase immobilized undergoes inactivation and the decrease in the conversion on your it's first 3 recycles. Being thus immobilized lipase onto modified silica becomes an attractive for application and reuse in the synthesis processes (Yu *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2012; Zhou *et al.* 2013; Barbosa *et al.*, 2014). In addition to the number of cycles, it was possible from the equation 03 and 04 determine the half-life of the immobilized biocatalysts (Table 6).

Table 6: Half-life of the immobilized biocatalysts.

	PA-SC	PA-MS	LC-SC	LC-MS
Inactivation constant (h⁻¹)	2.15	5.95	3.97	8.65
Half-life (h)	206.57	571.25	285.90	622.58

It is noted that the biocatalysts immobilized onto supports modified by different immobilization techniques had longer half life (571 and 623 h for physical adsorption and covalent binding, respectively) compared to the immobilized onto silica control (207 and 286 h for physical adsorption and covalent binding respectively).

The operational stability results in the transesterification reaction media modified corroborate the immobilization yield results showing synergistic effect in this study, once that the increase in half-life for biocatalyst immobilized by physical adsorption in modified support was approximately 2.8 times greater than the control support. Slightly smaller increase was observed when used covalent binding technique, 2.2 times. The greatest contribution to the good performance of the immobilized enzyme is provided by the holder. If side one of a carefully selected support may increase the half-life of the immobilized enzyme on the other imprudent choice may adversely affect not only the stability, but the overall system performance (Mendes *et al.*, 2011).

3.3. Morphological and Physico-Chemical Characterisation of Silica and Immobilized Biocatalyst

Structural analysis is needed to highlight the physico-chemical and morphological modifications imparted by catalytic conditioning, particularly the effect of IL on modified silica and its suitability for immobilization of lipase.

In order to find one possible explanation for the synergistic effect observed in this study for the modified support with IL, were made to correlate enzyme structural features and the supports after the immobilization of the enzyme. Structural characteristics of silica and immobilized lipase were assessed by the combined use of scanning electron microscopy (SEM) and thermogravimetric analysis (TG), and specific surface area and porous properties by the B.E.T. method and Fourier transform infrared (FTIR).

3.3.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The silica modified with IL had a positive influence on enzymatic activities in hydrolysis and transesterification reactions, the use of others morphological analyzes complements this study. Therefore, SEM can be used to study the catalytic activity mechanism through surface analysis and particle morphology investigations (Figure 3).

SEM is widely used to evaluate the surface morphology of silica obtained by the sol-gel technique. With SEM it was possible to verify that the addition of ionic liquid during the sol-gel process the silica formed a porous surface structure of channels and layers of irregular forms (Figure 3b and 3d). This difference in structure could influence the immobilization of enzymes, because the porosity is an important factor in the immobilization of an enzyme in the pores and on the support surface without any effect on the structural stability of the enzyme (Talbert and Goddard, 2012).

Although changes in the silica structure with IL improved the enzymatic activity, synergistic effect was observed, the effect of morphology improvement on catalytic reactions only be associated with higher of porosity, surface area and pore volume.

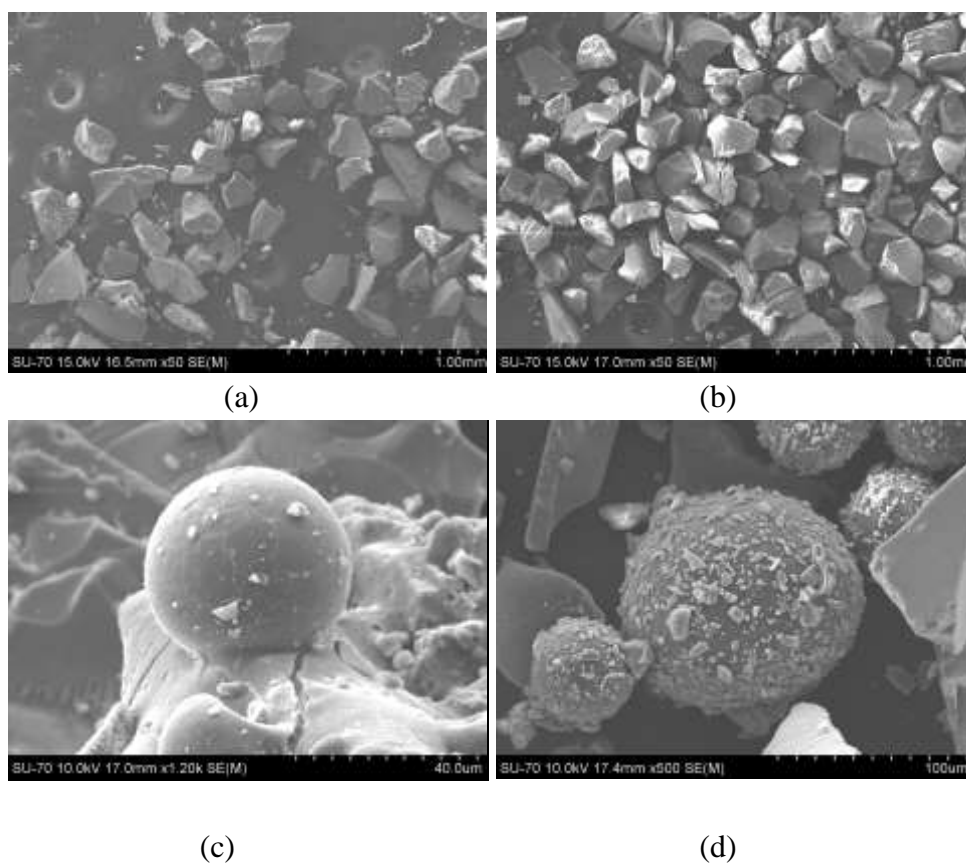


Figure 3: Scanning electron micrographs of the lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized: PA-SC (a), PA-MS (b), CB-SC (c) and CB-MS (d).

3.3.2 Specific Surface Area and Porous Properties

As regards isotherms and hystereses (Figure 4a and Figure 4b), particles are represented by isotherm I and hysteresis type IV for SC (microporous solids with crevices where the pores slightly exceed the diameter of the molecular adsorbent) and type IV isotherm and type II hysteresis for MS (solids with cleft pores in the mesopore range with distribution and defined form; also associated with pores type bottle). The isotherms and hysteresis of physical adsorption by immobilized biocatalysts show the same behavior of the SC and MS supports (Figure 4). Although when immobilized by covalent binding in SC, the biocatalyst has type I hysteresis associated with porous materials consisting of hard agglomerates of uniform size spherical particles regularly ordered, cylindrical capillaries models. For construction in MS hysteresis is type II (Sing, 1985).

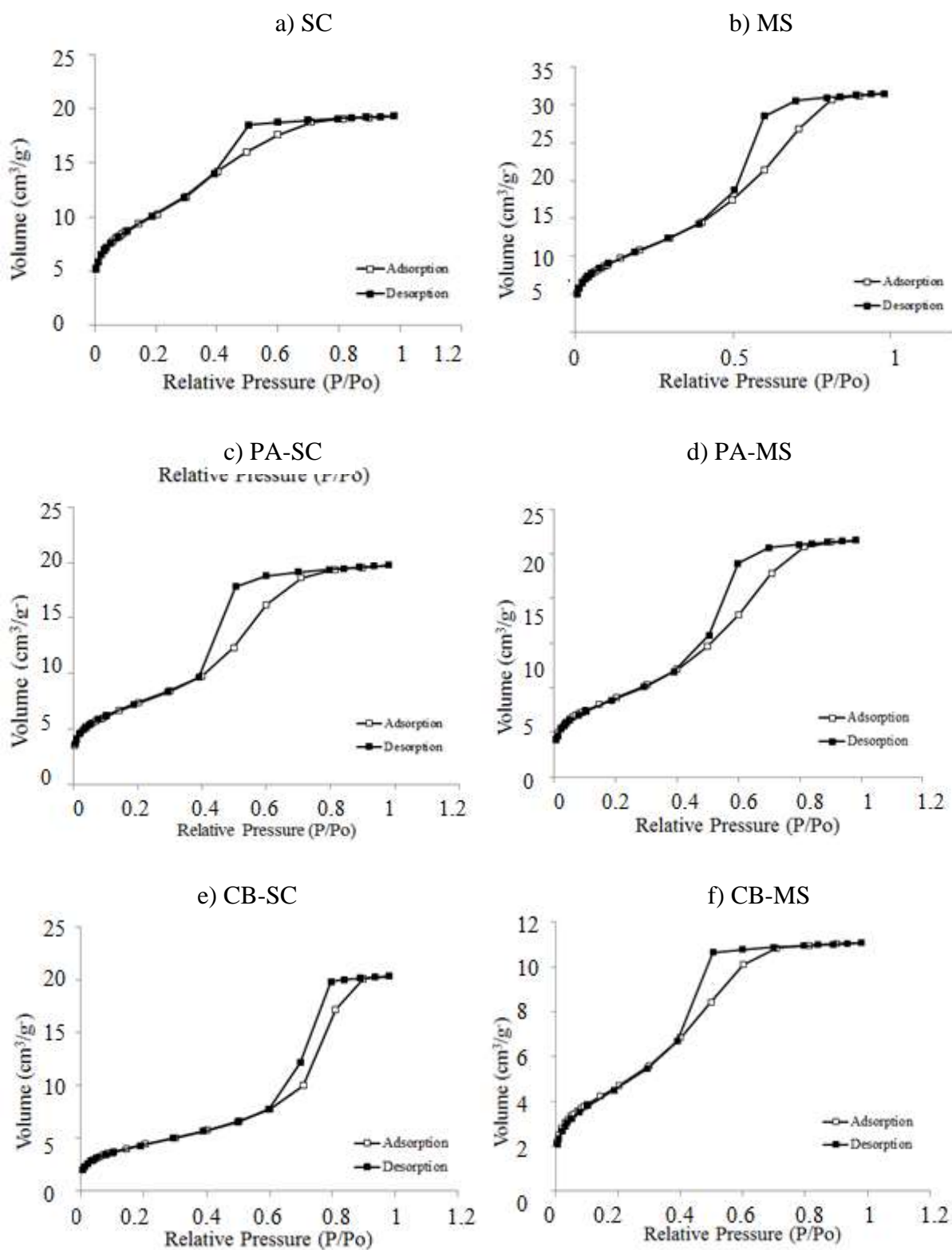


Figure. 4: Nitrogen adsorption–desorption isotherms of the silica control (SC) and modified silica (MS) and immobilised biocatalysts by physical adsorption (PA-SC and PA-MS).

Table 7 presents the results obtained by Carvalho *et al.*, (2016) for the supports for the control and modified and biocatalysts immobilized by covalent binding to comparison purposes with the physical adsorption technique. The significant increase in pore volume and surface area when the ionic liquid was added in the process of obtaining silica. Hu *et al.* (2012) obtained an opposite effect after silica was modified by imidazole-based ionic liquids for immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* and the ILs resulted in a decrease of all textural parameters like surface area, pore volume and pore diameter. These results indicated that the modification of surface and textural parameters was connected with the type of IL functional group, i.e. the various organic groups of ionic liquid have different hydrophobicity, extensibility, flexibility and spatial conformation, and their effect on pore structure differs.

Table. 7 Physico-chemical properties of the silica without (SC) and with ionic liquid (MS) and immobilized biocatalysts.

Sample	Surface area (m ² .g ⁻¹)	Pore volume (cm ³ .g ⁻¹)
SC*	799.5	0.57
MS*	853.5	1.02
PA-SC	579.9	0.64
PA-MS	706.8	0.87
CB-SC*	349.4	0.67
CB-MS*	371.8	0.35

*According Carvalho *et al.*, (2016).

Therefore, in this study there was also a positive influence on the number of coupled enzymes onto modified silica and consequent increased yield immobilization previously mentioned, possibly also the result of migration of acyl residual between the amino groups and hydroxyl groups of the BC lipase to ionic liquid-modified mesoporous silica.

The results clearly shows that in the presence of an ionic liquid pore diameter increases. As expected, SC and MS display pore volume distribution and narrowing of pores resulting from the immobilization of the lipase. This confirmed that the ionic liquid influences the surface area and also the pore size. Therefore, there was also a positive influence on the number of coupled enzymes and consequent increased yield immobilization previously mentioned (33%

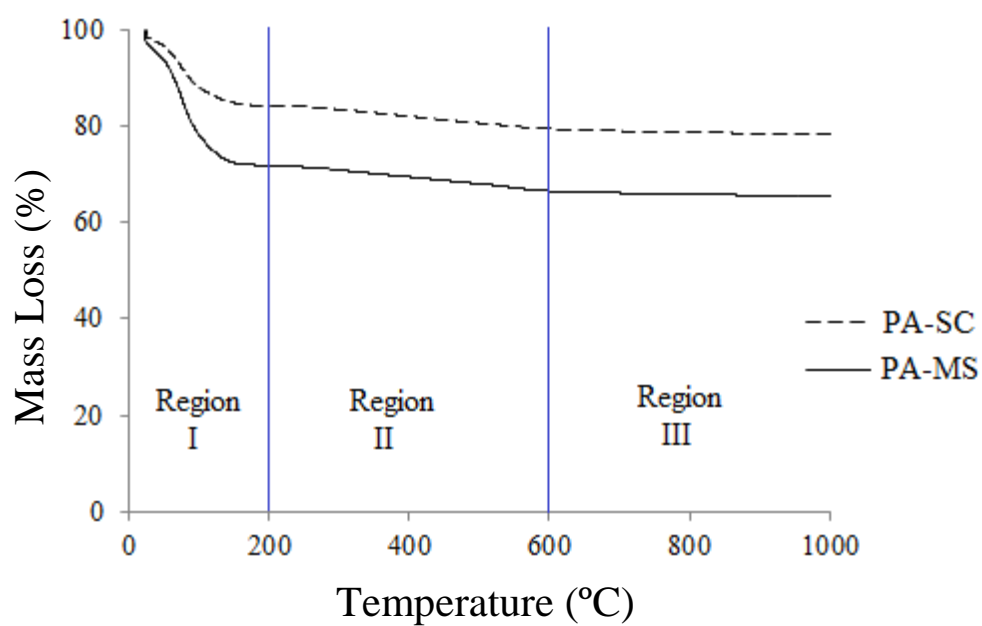
for PA-SC, 64% for PA-MS, 200% for CB-SC and 250% for CB-MS), possibly also the result of migration of acyl residual between the amino groups and hydroxyl groups of the LBC to ionic liquid-modified silica, confirming the synergistic effects. The increase of the pore volume can mean that the lipase aggregate formed on the surface SC and the modified silica support is immobilized onto the pores.

3.3.3. Thermogravimetric Analysis

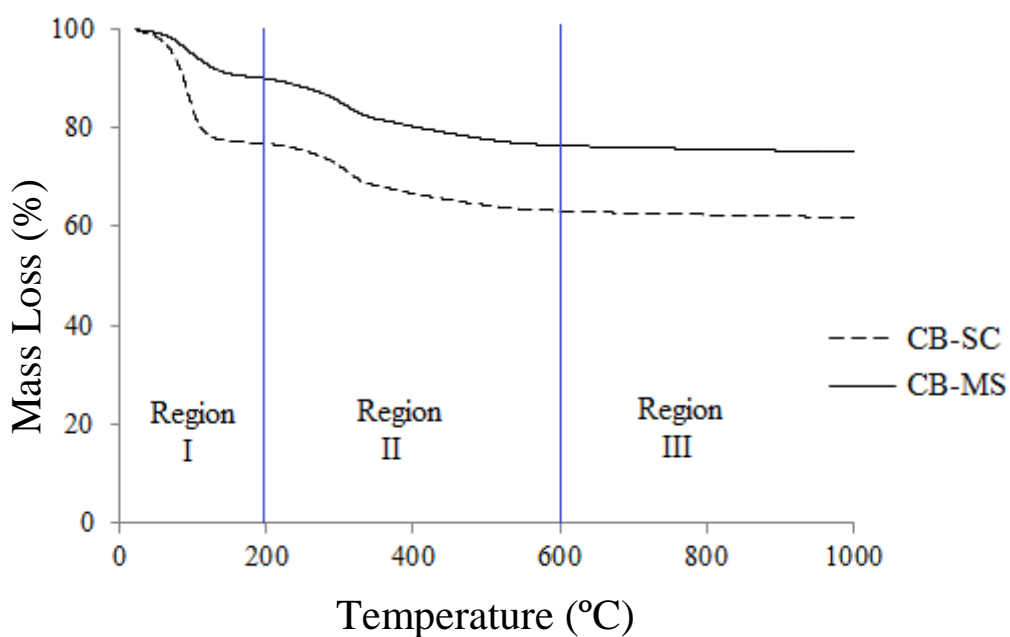
The mass loss obtained from TG curves in the range of 25 to 1000 °C allowed us to observe degradation of the enzyme present in the samples, extraction of the water in the surface and in the pores, definitive carbonisation, and other factors associated with condensation of silanol groups. Thermogravimetric analysis of samples (PA-SC, PA-MS, CB-SC and CB-MS) were divided into three regions as a function of temperature: (25-200°C), II (200-600°C) and III (600-1000°C) (Figure 5 and Table 8).

As noted in Figure 5a, the biocatalyst immobilized by physical adsorption in support control presented less weight loss when compared to immobilization in support modified with ionic liquid. Possibly, in region I it is the decomposition of not reacted silanol groups on the silica synthesis process. Furthermore, in this region are present organic constituents (C, H, O and N), in the form of volatiles either present or formed by the beginning of lipase decomposition, which indicates increased presence of lipase on the support immobilized on modified silica thus justifying double immobilization yield for this immobilization technique (Souza *et al.*, 2013; Arakaki *et al.* 2004; Qiu *et al.* 2007).

The mass loss of the biocatalysts immobilized have the same profile as the supports with and without IL. However, the weight loss for the immobilized biocatalysts was more pronounced in region I and we can associate it with the decomposition of organic and amino groups, i.e. the enzyme present on the surface or superficial pores of support in according to described by Soares *et al.* (2004).



(a)



(b)

Figure 5: Thermogram of the lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized by physical adsorption (a) and covalent binding (b) onto silica control or modified silica.

Table 8: Total mass loss of the lipase from *Burkholderia cepacia*, immobilized onto silica support control or modified silica.

Temperature (°C)	PA-SC	PA-MS	CB-SC*	CB-MS*
25-200	15.7	28.1	23.4	10.2
200-600	5.7	7.4	17.7	15.1
600-1000	1.5	1.7	2.2	1.7

*According Carvalho *et al.*, (2016).

Mass loss for the biocatalyst immobilized by covalent binding on SC and MS was extensively discussed by Carvalho *et al.*, (2016). However, compared with the physical adsorption technique is valid, because the opposite effect can be observed and exposed Figure 5. Greatest mass loss in the biocatalyst immobilized by covalent binding on silica control attributed to the presence of lipase only on the surface of some porous support, resulting in this area a greater loss due to exposure of sensitive organic groups immobilized on the support surface.

According to Lee *et al.*, (2009) the absence of great attenuations in Region II (Figure 5a) indicates that there were no supports of covalent binding which could possibly have been generated during the immobilization process, confirming that the type of binding of the enzyme to the support is purely physical adsorption and Figure 5b is covalente binding. Justifying greater operational stability of the biocatalyst immobilized by covalent binding in support modified with ionic liquid.

3.3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

The efficiency of the immobilization lipase as regards the silica with additive was also assessed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Main peaks in the FTIR spectrum of the silica with or without IL, as well as of the free lipase from *Burkholderia cepacia*, and their immobilized forms are apresented in Table 9 for comparison purposes with Figure 6.

Table 9: Main peaks in the FTIR spectrum of LBC, SC, MS, PA-SC, PA-MS, CB-SC and CB-MS samples and tentative assignment according to literature

Wavenumber (cm^{-1})	Assignments	LBC	SC	MS	PA- SC	PA- MS	CB- SC	CB- MS
695	Amide IV and V	X			X	X	X	X
1100 to 1000	C-C and C-N	X						
620 and 1000	Si-O-R		X	X	X	X	X	X

The bands representing amides IV and V are also presented in the spectra of LBC, PA-SC, PA-MS, CB-SC and CB-MS, thereby revealing the presence of LBC in immobilized systems. However, the vibrational peaks around 1100 to 1000 cm^{-1} were associated with the C-C and C-N composite vibrations of the protein chain of the LBC free or immobilized. We also observed characteristic bands for the SC, MS, PA or CB onto SC and MS of Si-O-Si at 620 and 1000 cm^{-1} (Anuar *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2012; Portaccio *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2010).

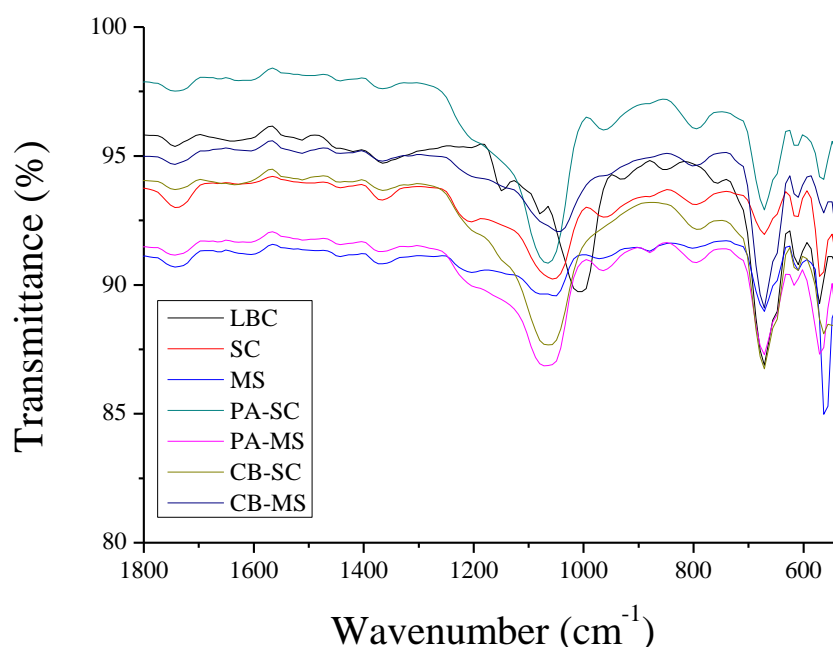


Figure 6: FTIR spectrum of lipase de *Burkholderia cepacia* free (LBC), SC, MS, PA-SC, PA-MS, CB-SC

4. Conclusions

In this study, modified supports with ionic liquid protic acid (pentanoic acid N-methylmonoethanol amine) applied for immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* by the physical adsorption or covalent binding method were efficient for this transesterification reaction and a synergistic effect was observed for this biocatalyst. We conclude that the ionic liquid protic, N-methylmonoethanolamine pentanoate, promoted an improvement in the support surface through the formation of channels and provided immobilization of LBC and this synergistic effect is probably due to the fact that the immobilized enzyme was able to rearrange its catalytic site in its active form onto the silica support. These results were confirmed by SEM and B.E.T. morphological analysis and physico-chemical by TG and FTIR. The experimental design proved to be an efficient way to study the effect of the variables on the process and the maximum conversion to ethyl esters was 85% (physical adsorption onto modified silica) and 96% (covalent binding onto modified silica) in the conditions: temperature (40 °C), enzyme concentration (20% w.w⁻¹) and oil:alcohol ratio (1:7). Thus, immobilized lipase in silica produced with ionic liquid has the potential to produce esters.

Acknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES and UNIT for their financial support of this work, and for research scholarships. They also acknowledge the University of Aveiro for characterisation analyses performed in CICECO.

Supporting Information

Table 10: The run of experimental design factorial design.

Run	Variable		
	Temperature (°C)	Molar ratio (oil:ethanol)	Enzyme loading (%)
1	-1 (40)	-1 (1:7)	-1 (10)
2	1 (60)	-1 (1:7)	-1 (10)
3	-1 (40)	1 (1:13)	-1 (10)
4	1 (60)	1 (1:13)	-1 (10)
5	-1 (40)	-1 (1:7)	1 (20)
6	1 (60)	-1 (1:7)	1 (20)
7	-1 (40)	1 (1:13)	1 (20)
8	1 (60)	1 (1:13)	1 (20)
9	0 (50)	0 (1:10)	0 (15)
10	0 (50)	0 (1:10)	0 (15)
11	0 (50)	0 (1:10)	0 (15)

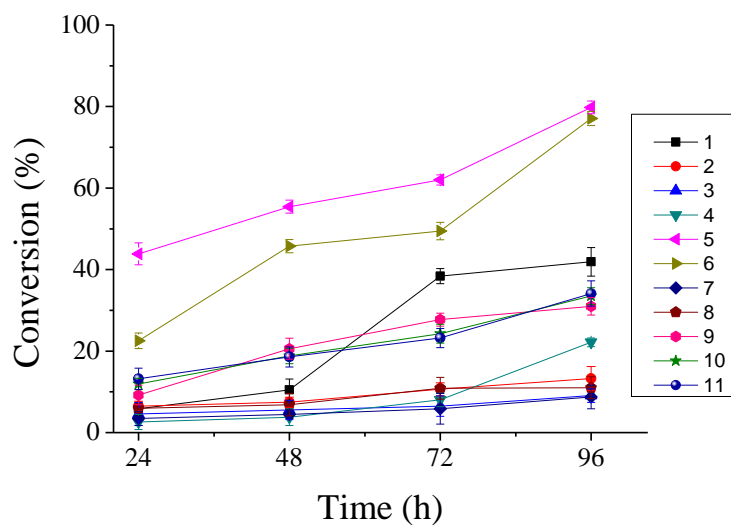


Figure 7: Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto silica control by physical adsorption at each 24h according to the variables shown in Table 10.

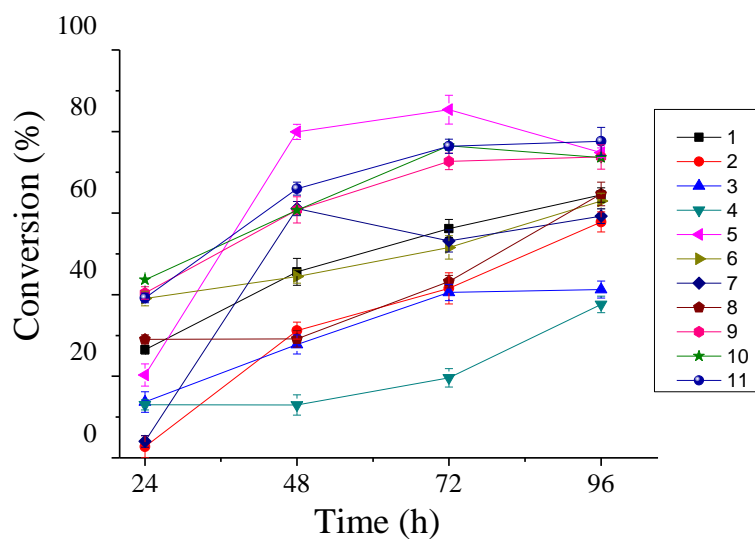


Figure 8: Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto modified silica by physical adsorption at each 24h according to the run and variables shown in Table 10.

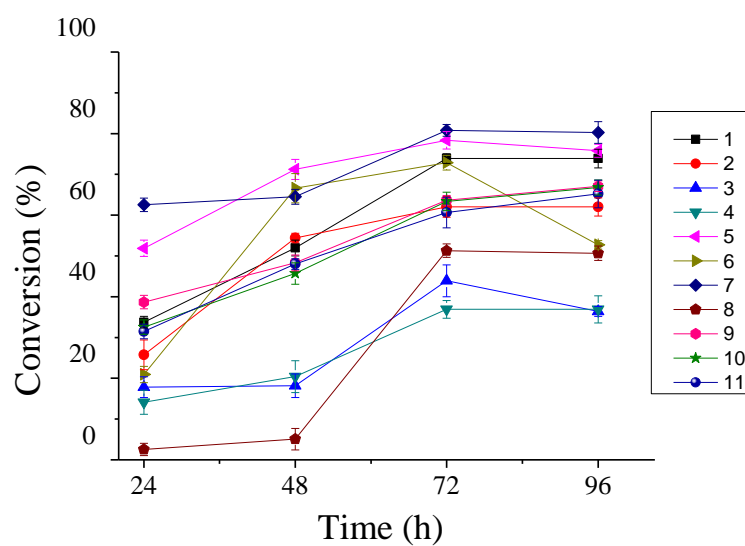


Figure 9: Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto silica control by covalent binding at each 24h according to the run and variables shown in Table 10.

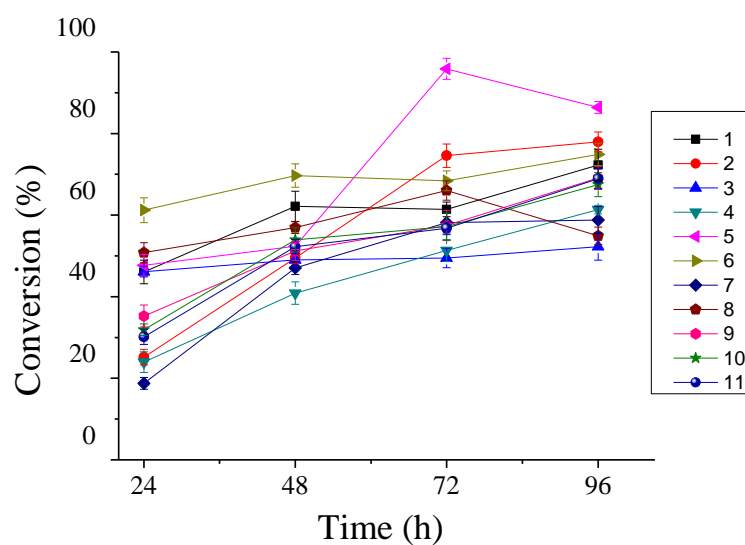


Figure 10: Ethyl esters conversion using the biocatalyst immobilized onto modified silica by covalent binding at each 24h according to the run and variables shown in Table 10.

References

- Alvarez, V. H.; Mattedi, S.; Martin-Pastor, M.; Aznar, M.; Iglesias, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. *Fluid Phase Equilib.* **2010**, 299, 42–50.
- Andrade, L.H.; Rebelo, L.P.; Netto, C.G.C.M.; Toma, H.R. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized. *J Mol Catal B-Enzym.* **2010**, 66, 55–62.
- Anuar, S.T.; Zhao, Y.; Mogo, S.M.; Curtis, J.M. The development of a capillary microreactor for transesterification reactions using lipase immobilized onto a silica monolith. *J Mol Catal B-Enzym* **2013**, 92, 62–70.
- Arakaki L. N.; Espinola, J. G.; Fonseca, M. G.; Sousa, A. N.; Arakaki, T.; Airoidi, C. Thioglycolic acid grafted onto silica gel and its properties in relation to extracting cations from ethanolic solution determined by calorimetric technique. *Journal of Colloid and Interface Science.* **2004**, 273, 211–217.
- Barbosa, A.S., Silva M.A.O., Carvalho N.B., Mattedi, S., Inglesias, M.A., Fricks, A.T., Lima, A.S., Franceschi, E., Soares, C.M.F., Imobilização de lipase por encapsulação em sílica aerogel. *Quim. Nova*, **2014**, 37, 969-976.
- Cabrera Padilla, R.Y.; Melo Filho, E.; Pereira, M.M.; Figueiredo, R.T.; Fricks, A.T.; Franceschi, E.; Lima, A.S.; Silva, D.P.; Soares, C.M.F. Use of ionic liquids as additives for the immobilization of lipase from *Bacillus* sp. *J Chem Technol Biotechnol.* **2014**, 90, 1308.
- Cabrera-Padilla, R.Y.; Lisboa, M.C.; Fricks, A.T.; Franceschi, E.; Lima, A.S.; Silva, D.P.; Soares, C.M.F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2012**, 39, 289–298.
- Carvalho, L. M.; Carvalho, H. W. L; Carvalho, C. G. P., Oliveira, I. R.; Lira, M. A.; Ferreira, F. M. B; Tabosa, J. N.; Menezes, V. M. M.; Santos, D. L.; Moitinho, A. C.; Marques, M. G.; Rodrigues, C. S.; Castro, C. R.; Oliveira, T. R. A.; Santos, M. L. Desempenho de Cultivos de girassol em Monocultivo e em Consórcio, nos Estados de Sergipe e Bahia, nos anos agrícolas de 2010-2012. Comunicado Técnico, **2014**.

Carvalho, N.B.; Oliveira, M.A.S.; Fricks, A.T.; Franceschini, E.; Dariva, C.; Zanin, G.M.; Lima, A.S.; Soares, C.M.F. Evaluation of activity of *Bacillus* lipase (free and immobilized) treated with compressed propane. *J Mol Catal B-Enzym.* **2014**, 99:130-135.

Carvalho, N. B.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Quimica. Nova.* **2015**, 38, 399-409.

Carvalho, N.B.; Vidal, B.T.; Barbosa, A.S.; Pereira, M.M.; Mattedi, S.; Freitas, L.S.; Fricks, A.T.; Lima, A.S.; Soares, C.M.F. Protic ionic liquid: an alternative additive for obtaining modified silica and after applied in lipase immobilization by covalent binding. *Energy Fuels.* (submitted to the periodic).

Chen, X.; Du, W.; Liu, D.; Ding, F. Lipase mediated methanolysis of soybean oils for biodiesel production. *J Chem Techno Biotechnol.* **2008**; 83:71.

Cui, C.; Tao, Y.; Ge, C.; Zhen, Y.; Chen, B.; Tan, T. Synergistic effects of amine and protein modified epoxy-support on immobilized lipase activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **2015**, 133, 51–57.

Fernandez-Lorente, R.; Fernández-Lafuente, J.; Palomo, C.; Mateo, A.; Bastida, J.; Coca, T.; Haramboure, O.; Hernandez-Justiz, M.; Terreni, J.; Guisan, J. M. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *Mol. Catal.B: Enzym.* **2001**, 11, 649.

Freitas, L.; Da Rós, P.C.M.; Santos, J.C.; Castro, H.F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). *Process Biochem.* **2009**, 44, 1068-1074.

Hu, Y.; Tang, S.; Jiang, L.; Zou, B.; Yang, J.; Huang, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochem.* **2012**, 47, 2291–2299.

Ispas, C.; Sokolov, I.; Andreescu, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393:543–554.

Jesionowski T.; Zdarta J.; Krajewska B.; Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption*, 2014, 20, 801-821.

Kato, R.; Gmehling, J. Activity coefficients at infinite dilution of various solutes in the ionic liquids [MMIM]⁺[CH₃SO₄]⁻, [MMIM]⁺[CH₃OC₂H₄SO₄]⁻, [MMIM]⁺[(CH₃)₂PO₄]⁻, [C₅H₅NC₂H₅]⁺ [(CF₃SO₂)₂N]⁻ and [C₅H₅NH]⁺ + [C₂H₅OC₂H₄OSO₃]⁻. *Fluid Phase Equilib.* **2004**, 226, 37–44.

Lee, D.G.; Ponvel, K.M.; Kim, M.; Hwang, S.; Ahn, I.K.; Lee, C.H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. *J Mol Catal B-Enzym.* **2009**, 57, 62-66.

Liese, A.; Hilterhaus, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6236-6249.

Mendes, A.A.; Oliveira, P.C.; Castro, H.F., Giodano, R.L.C. Aplicação da quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim. Nova.* **2011**, 34, 831-840.

Noureddini, H.; Gao, X.; Philkana, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour. Technol.* **2005**, 96, 769–777.

Oliveira, M. V. S.; Ros, P. C. M.; Mattedi, S.; Castro, H. F.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as additive. *Acta Scientiarum. Technology.* 2014, 36, 445-451.

Palomo, J.M.; Fuentes, M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Guisan, J.M.; Fernández-Lafuente, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules.* **2003**, 4, 1.

Portaccio, M.; Ventura, B.D.; Mita, D.G.; Manolova, N.; Stoilova, O.; Rashkov, I.; Lepore, M. FT-IR microscopy characterization of sol-gel layers prior and after glucose oxidase immobilization for biosensing applications. *J Sol-Gel Sci Techn.* **2011**, 57, 204–211.

Qiu H.; Jiang, Q.; Wei, Z.; Wang, X.; Liu, X.; Jiang, S. Preparation and evaluation of a silica-based 1-alkyl-3-(propyl-3-sulfonate) imidazolium zwitterionic stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* **2007**, 1163, 63–69.

- Ribeiro, L.M.O., Santos, B.C.S., Almeida, R.M.R.G. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst, *Biomass and Bioenerg.* **2012**, 47, 498-503.
- Ros, P.C.M., Castro, H.F., Carvalho, A.K.F., Soares, C.M.F., Moraes, F.F., Zanin, G.M. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 39, 529-536.
- Sagiroglu, A. Conversion of sunflower oil to biodiesel by alcoholysis using immobilized lipase. *Artif Cell Blood Substit Biotechnol.* **2008**, 36, 138-149.
- Sing, K.S.W.; Everett, D.H.; Haul, R.A.W.; Moscou, L.; Pierotti, R.A.; Rouquérol, J.; Siemieniewska, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 603-619.
- Soares, C.M.F.; Santos, O.A.; Castro, H.F.; Moraes, F.F.; Zanin, G.M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. *Appl Biochem Biotech.* **2004**, 113, 307-319.
- Souza, R.L.; Resende, W.C.; Barão, C.E.; Zanin, G.M.; Castro, H.F.; Santos, O.A.A.; Fricks, A.T.; Figueiredo, R.T.; Lima, A.S.; Soares, C.M.F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. *J Mol Catal B-Enzym.* **2012**, 84,152– 159.
- Talbert, J. N.; Goddard, J. M. Enzymes on material surfaces. *Colloid Surface B.* **2012**, 93, 8–19.
- Tran, D.-T.; Yeh, K.-L.; Chen, C.-L.; Chang, J.-S. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase. *Bioresour. Technol.* **2012**, 108, 119–127.
- Vasconcellos, A., Paula, A.S., Luiz-Filho, R.A., Farias, L.A., Gomes, E., Aranda, D.A.G., Nerya, J.G. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and Mesoporous Materials* **2012**, 163, 343-355.

Verger, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **1997**, 15, 32.

Yang, J.; Hu, Y.; Jiang, L.; Zou, B.; Jia, R.; Huang, H.; Enhancing the catalytic properties of porcine pancreatic lipase by immobilization on SBA-15 modified by functionalized ionic liquid. *Biochem. Eng. J.*, **2013**, 70, 46-54.

Yu, C.Y., Huang, L.Y., Kuan, I.C., Lee, S.L. Optimized production of biodiesel from waste cooking oil by lipase immobilized on magnetic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 24074-24086.

Zarcula, C.; Corîci, L.; Croitoru, R.; Ursoiu, A.; Peter, F. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method. *J Mol Catal B-Enzyme.* **2010**, 65, 79-86.

Zhou, Z., Hartmann, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 3894-392.

Zhu, L.P., Jiang, J.H.; Zhu, B.K.; Xu, Y.Y. Immobilization of bovine serum albumin onto porous polyethylene membranes using strongly attached polydopamine as a spacer. *Colloids Surf. B.* **2011**, 86, 111-118.

Zou, B., Song, C., Xu, X., Xia, J., Huo, S., Cui, F. Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. *App. Surf. Scien.* **2014**, 311, 62-67.

ARTIGO IV

A new strategy to microporous silica immobilization onto *Burkholderia cepacia* lipase

Nayara B. Carvalho¹; Jussimara Mendonça¹; Elisangela Muncinelli Caldas²; Silvana Mattedi³;
Renan Tavares Figueiredo¹; Lisiane dos Santos Freitas⁴; Edilson V. Benvenutti²; Álvaro S.
Lima¹; Cleide M. F. Soares^{1*}

¹ Institute of Technology and Research, University Tiradentes, Aracaju-SE, Brazil.

² Institute of Chemistry, Federal University of Great Southern River, Porto Alegre-RS, Brasil.

³ Department of Chemical Engineering, Federal University of Bahia, Salvador-BA, Brazil.

⁴ Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, São Cristovão-SE, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 3218 2190. Address: Av. Murilo Dantas, Farolândia, CEP: 49010-390. E-mail address: cleide.soares@pq.cnpq.br

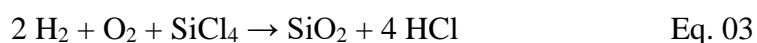
Abstract: In the framework of the science of materials combined with biotechnology, different microparticles are studied and can become a deciding factor for many different applications. Among the studies, applications can be realized based on surface area and groups present on the surface micro materials, such as microporous silica and the possibility of formation of favorable aggregates immobilization onto lipase become a powerful biocatalyst with stability operational. In this context the work directed to the use of microporous silica Aerosil® for immobilization onto lipase by physical adsorption or covalent binding at different molar ratios (1:0.2, 1:1 and 1:1.8) in the presence of the ionic liquid additive. The immobilized biocatalysts were applied in patterns hydrolysis reactions of olive oil for evaluation of operational stability. The structural changes that have occurred in the silica after immobilization by adsorption and chemical treatment with APTMS and glutaraldehyde for covalent immobilization were monitors by Nitrogen Adsorption and Desorption (BET method), Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). We can see that the biocatalysts immobilized by covalent binding technique showed higher operational stability compared to physical adsorption technique, reaching 50% of the initial activity after the 13th recycle. But the presence of the additive in the immobilization process did not result in greater stability, only provided the increase in initial activity. For analyzing the surface area and pore volume, it was possible to verify the formation of clusters around the lipase confirmed through the SEM, as well as the presence of silica and grouping of lipase by means of FTIR. Concluded that this immobilization technique on silica Aerosil® presents itself as a new lipase immobilization strategy

Keywords: microporous silica, Aerosil®, immobilization, lipase.

1. Introduction

The recovery and operational stability of the immobilized biocatalyst is the major objective for their industrial use in biocatalysis. To overcome this difficulty, several studies have been done to immobilize homogenous catalysts onto supports with different porosities. The physical nature of the support, e.g., morphology, size and distribution of pores also directly influence the yield of immobilization and for diffusional effects caused by mass transfer between the liquid medium and the immobilized biocatalysts. The supports can be classified in micro-, meso- or macro-porous, and among natural and synthetic supports highlights the silica due to their polar properties and which are considered efficient adsorption sites, chemical and thermal stability and ease of preparation (Carvalho *et al.*, 2015; Benvenuti *et al.*, 2009;. Airoidi, 2008; Duran *et al.*, 2006).

The Aerosil[®] is a commercial microporous silica with high purity and extremely fine particle size amorphous registered trade mark for a fumed silica from Degusa AG (Frankfurt, FRG). Is prepared by the vapor phase hydrolysis of silicon halides followed by hydrothermal treatment at high temperature and high water vapor pressure. According to Degusa (1993) during this process, the SiCl₄ gas is converted spontaneously and then reacted with the water vapor formed in an atmosphere containing hydrogen and heated oxygen (Equation 1, 2 and 3).



A considerable amount of heat is lost and the only by-product of this reaction is hydrochloric acid (gas) which is separate from the silica. Different grades of silica Aerosil[®] are obtained by varying the temperature and the duration of the hydrothermal treatment such that changes in the water content, the surface area and the pore structure are produced (Mathias and Wannemacher, 1988).

Various groups can be bonded chemically to the surface of silica, such as organosilicon compounds for the modification of surface characteristics (hydrophilicity and hydrophobicity). The Aerosil[®] particles are not isolated but combined through hydrogen binding to form stable

aggregates that can be hundreds of nanometers in size when bound aggregates originate agglomerates and thus a three-dimensional network (Carvalho *et al.*, 2015).

There are several types of Aerosil[®] with surface areas (S) ranging from 50 m².g⁻¹ to 380 m².g⁻¹, average particle size of 7 nm and 40 nm. These supports with a low surface area (S < 200 m².g⁻¹) are composed of regular uniform spherical particles with a fairly narrow size distribution, whereas Aerosil[®] with higher surface areas (200 to 400 m².g⁻¹) have less uniform particles and often consist of intergrowths of finer particles separated by small gaps, i.e. they contain pores (Mathias and Wannemacher, 1988). The Aerosil[®] fumed silica have primary particles with low and even nonporous surface. For decades, microporous silica is widely used as adsorbents in various drying, separation and purification processes for gaseous and liquid mixtures. They are also used as catalyst supports, lubricant thickeners and fillers for varnish, paint systems, unsaturated polyester resins, laminating resins and gel, silicone rubber, adhesives, sealants, inks and cosmetics (Khalil, 1981; Degusa, 1993).

Also according to Degusa (1993) silane and siloxane groups found on the surface of without treatment microporous silica Aerosil[®], so the support has a high affinity for water - hydrophilic - capable of adsorbing significant quantities of water, maintaining the formed aggregates. When the silane groups of the fumed silica surface reacted with organosilicon compounds chemically linked to the hydrophilic surface character can be changed, making it hydrophobic. The silica support of hydrophobicity can result in possible use in enzyme immobilization, which was not found, until the present moment, studies carried in order to immobilize silica Aerosil[®] microporous and silica Aerosil[®] microporous modified with the ionic liquid, onto lipase.

Thus, in this work, the preparation of microporous silica Aerosil[®] immobilized onto lipases by two different techniques (physical adsorption and covalent binding) was studied. Biocatalysts were synthesized, varying the mass ratio (lipase: Aerosil[®]) used were: 1: 0.2; 1: 1 and 1: 1.8, in order to understand the influence of the enzyme loading in the yield of immobilization and in the operational stability. The samples were characterized by using infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, N₂ Adsorption–Desorption isotherms (BET method), Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM)

2. Materials and methods

2.1. Materials

The microporous silica (Aerosil[®] 200 fumed silica) utilized has a surface area of 200 m².g⁻¹ and was commercially obtained from Degusa. The protic ionic liquid (N-pentanoate Metilmonoetanolamina) was provided by the Federal University of Bahia (UFBA). Lipase from *Burkholderia cepacia* (Amano Lipase, ≥ 1900 U.g⁻¹, pH 7.0, 50 °C) was purchased from Sigma Aldrich (Japan). Other chemicals were of analytical grade and used as purchased.

2.2. Physical Adsorption (PA) microporous support (Aerosil[®]) onto lipase from *Burkholderia cepacia*

The physical adsorption method (PA) was realized from the contact of lipase from *Burkholderia cepacia* with Aerosil[®] untreated, agitated for 1 h in hexane and was washed with water and dried cap and vacuum for 3 h. The mass ratios (lipase: Aerosil[®]) used were: 1: 0.2; 1: 1 and 1: 1.8. Only after the study of the operational stability of biocatalysts immobilized by physical adsorption technique in three different molar ratios was held immobilization in the presence of the ionic liquid pentanoate N-methyl monoethanolamine additive (1% w.w⁻¹) with the biocatalyst, which obtained the highest operational stability.

2.3. Covalent binding (CB) the microporous support (Aerosil[®]) onto lipase from *Burkholderia cepacia*

For treatment of the microporous support, the Aerosil[®] was dried under vacuum for 2 h at 120 °C, then the dry support was submerged in toluene and added to 1 mmol of APTMS (3-aminopropyltrimethoxysilane) per 1 g of support, the system was placed under an inert atmosphere of argon with stirring (100 rpm) for 24 h at 90°C. The silanized support APTMS was dried with vacuum for 2 h at 120°C, washed with water and ethanol and dried again. The silanized Aerosil[®] was placed in contact with glutaraldehyde (5% v.v⁻¹) and stirred for 3 h at room temperature. After the treated support was washed with water and ethanol and vacuum dried for 2 h at 120 °C. Lipase was placed in contact with the active support and buffer (pH 7.0) with constant stirring at 4 °C for 3 h. The mass ratios (lipase: Aerosil[®]) used were: 1: 0.2; 1: 1 and 1: 1.8. The immobilized biocatalyst was washed with water and dried cap and vacuum

for 3 h. For immobilization in the presence of the ionic liquid pentanoate N-methyl monoethanolamine was added together with 1% ww enzyme solution, conforming Seccion 2.2.

2.4. Operational stability

Being one of the main objectives of lipase immobilization was realized to evaluate the operational stability of immobilized biocatalysts all produced. The biocatalysts were put into viscose cloth casing and added to the reactor at 37 °C containing the olive oil emulsion with pH 7 according to Soares *et al.* (1999). The liberated fatty acids in enzymatic hydrolysis were titrated with potassium hydroxide solution (0.04 M) in the presence of phenolphthalein as an indicator. All enzymatic activity determinations were replicated at least three times. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 μmol of free fatty acid per min (μmol.min⁻¹). After 10 min the reaction was removed from the bag and washed with hexane, drying the cloth enclosure with extractor fan chapel, the biocatalyst was used again in a new hydrolysis reaction.

2.5. Determination of the particle surface area, pore volume and diameter

N₂ adsorption-desorption isotherms were obtained at the N₂ boiling point temperature in a homemade volumetric apparatus connected to a turbo molecular Edwards vacuum line system, employing an Hg capillary barometer. Aerosil[®] were previously degassed at 70 °C, under vacuum, for 2 h. The specific area and pore size distribution were estimated by the BET (Brunauer, Emmett and Teller) and the BJH (Barret, Joyner and Hallenda) methods, respectively.

2.6. Scanning electron microscopy

The analysis in electronic microscopy were performed in Hitachi TM 300 equipment in order to verify the conformational changes in the media before and after treatment of Aerosil[®] and silica immobilized onto lipase from *Burkholderia cepacia*.

2.7. Fourier transform infrared spectra (FTIR)

The samples were submitted to FTIR analysis (Cary 630 FTIR – Agilent Technologies). Spectra were obtained in the wavelength range 400 to 4000 cm⁻¹.

3. Results and discussion

In this section will initially discussed the operational stability in the hydrolysis reaction of biocatalysts immobilized by two different techniques: physical adsorption and covalent binding in different molar ratios. After of the obtation of the biocatalyst was verified the operational stability and the influence of the use of the ionic liquid as additive. And yet, was evaluated the pH, the optimum temperature reaction and operational stability for immobilized biocatalysts: immobilized by physical adsorption silica onto lipase without the additive (PA), physical adsorption silica onto lipase in the presence of the additive (PA-LI), immobilized silica onto lipase by covalent binding without additive (CB), immobilized by covalente binding the silica onto lipase in the presence of the additive (CB-LI). Supports and immobilized biocatalysts were characterized by SEM, BET method and FTIR. The results are presented in the sequence.

3.1. Operational stability of immobilized biocatalysts by physical adsorption (PA) and covalent binding (CB)

In Figure 1 and 2 it can be observed the loss of activity over the cycles using biocatalysts immobilized by physical adsorption and covalent binding. For the physical adsorption technique, initial hydrolytic activity of the immobilized biocatalysts obtained were 1025, 1112 and 1083 U.g⁻¹ in the mass ratios 1: 0.2, 1: 1 and 1: 1.8, respectively, in that order for technical the covalent binding the hydrolytic activities were: 808, 750 and 936 U.g⁻¹.

In physical adsorption (Figure 1) the operational stability of the catalyst was unsatisfactory, in which the 3rd recycling the relative activity loss was obtained of approximately 50%. This results in low operational stability of the immobilized lipase Aerosil® probably due to the absence of adequate OH groups in the silica to physically strong adsorption of the lipase, and then the activation of the support with bifunctional agents is required.

In the method of immobilization by covalent binding (Figure 2) was performed silanization with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and activation with glutaraldehyde to immobilize of silica onto lipase. The lipase in mass ratios (lipase:silica) of 1: 0.2; 1: 1 and 1: 1.8 with the objective of adding spacer arm and finally immobilizing the enzyme on the support.

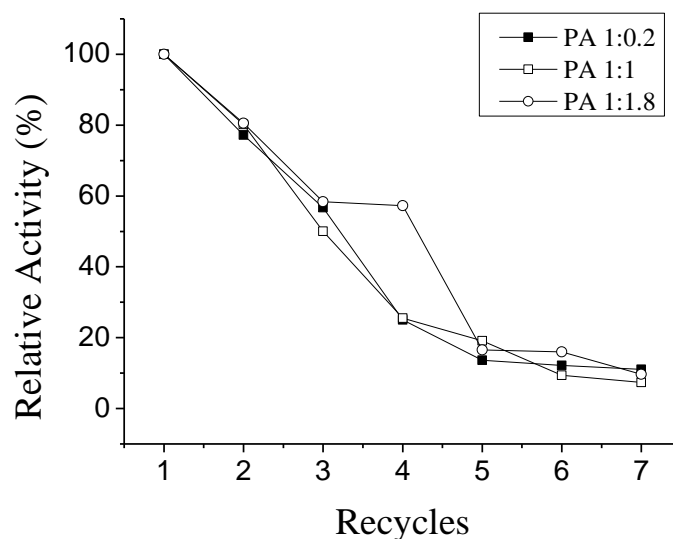


Figure 1: Operational stability silica Aerosil® immobilized lipase onto from *Burkholderia cepacia* in the physical adsorption technique at different mass ratios (37 ° C, pH 7, and 80 rpm 10 min).

In Figure 2, it is observed that although less initial hydrolysis activity, compared with the physical adsorption, the operational stability was provided after the silanization and activation of Aerosil® for different molar ratios. It is noteworthy that for the mass ratio (lipase: Aerosil®) 1: 0.2 to the 9 th recycle the relative activity remained between 80 and 100%, averaging approximately 50% only in the 13th recycle. This result is extremely satisfactory because one of the most important objectives of enzyme immobilization technology is to increase the operational stability of the biocatalyst, in this work silica iommobilized onto lipase from *Burkholderia cepacia*.

After, to evaluade use of the Aerosil® was verified the addition of ionic liquid in the immobilization method, we used the ratio by weight (lipase: Aerosil®) 1:0.2, since it presented a better operational stability and a lower amount of Aerosil® support for immobilization, according Figure 3. The operational stability of the immobilized biocatalyst was not very significant, but it is noteworthy that the presence of the ionic liquid increased the initial activity of the biocatalyst immobilized by physical adsorption and the covalent binding to 1538 U.g⁻¹ and 1302 U.g⁻¹, respectively. This effect is possibly due to activation of the lipase caused by ionic liquid additive, protecting the hydration layer around the enzyme and/or by conformational change as suggested in studies by Souza *et al.* (2013), Zou *et al.* (2014), Hu *et*

al., (2012), Hara *et al.*, (2010). According to Mohidem *et al.* (2011), during the process of detencion, possibly the additive can also modify the hydrophobicity of the microenvironment, influencing the humidity level inside the support to better results.

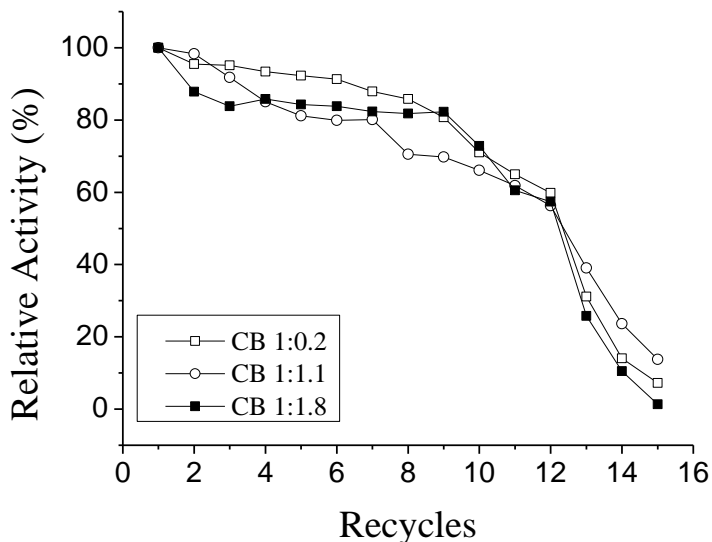


Figure 2: Operational stability silica Aerosil® immobilized onto lipase from *Burkholderia cepacia* by covalent binding method in different mass ratios (37 °C, pH 7, and 80 rpm, 10 min).

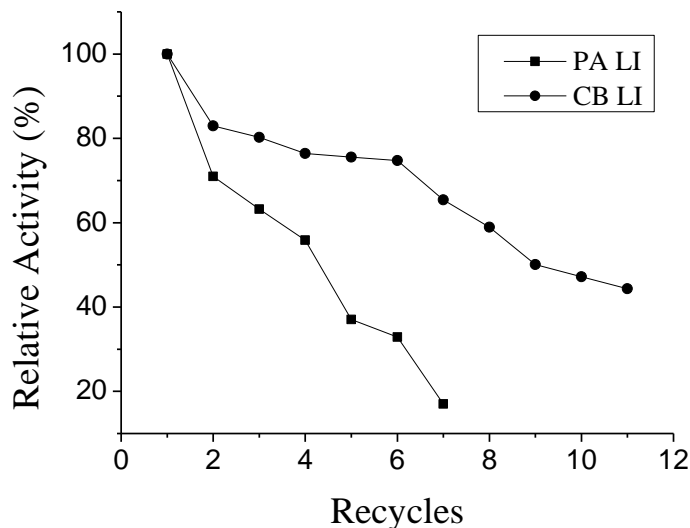


Figure 3: Operational stability silica Aerosil® immobilized onto lipase from *Burkholderia cepacia* by physical adsorption or covalent linkage in the presence of ionic liquid in the ratio mass 1:0.2 (37 ° C, pH 7, and 80 rpm 10min).

The influence on the reactivity of the silica gel surface is related to the availability of silanol groups surface, because the silanol groups are the main sites of reactive silica and because of the importance of these sites for the surface chemistry of silica. Based on this, several authors report that a step activation by heating and/or vacuum to the surface of silica at a temperature appropriate, it is necessary to remove the molecules of water physically adsorbed and leave the largest number of free silanol groups to react with the amine grouping of which is immobilized lipase (Zhuravlev, 2000; Arakaki *et al.*, 2004). The covalent immobilization of lipases insoluble materials is an interesting strategy to achieve stable heterogeneized biocatalysts as observed in this study.

3.2. Physico-chemical characterization and morphological

According to the characterization of the support surface, in Figure 4 it can be seen the profile of the isotherm of Aerosil[®] without and with treatment, where present profile micropores and mesopores, respectively.

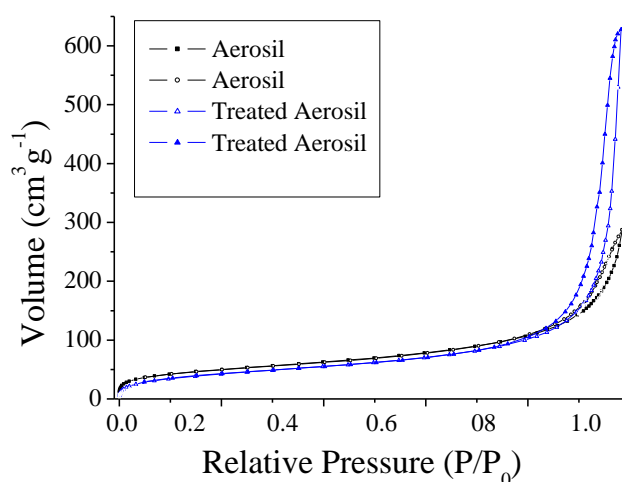


Figure 4: Isotherms of Aerosil[®] untreated and treated with APTMS and glutaraldehyde.

The same micropores profile was observed in the work of Caovilla *et al.* (2009) when analyzing the area Aerosil[®] as a source of silicon in the production of zeolite, which after treatment is obtained an increase in surface characteristics.

The distribution of pore size obtained by the BJH method are shown in Figure 5 and we can see that the Aerosil[®] untreated has small pores and then treaty changes occurred in the

profile of the isotherms (Figure 4), which now absorb more nitrogen in high values P/P0 corresponding to larger pores. This behavior is probably due to the spacer arms formed by glutaraldehyde and also the low surface area silica with a tendency to agglomerate. The surface silanol groups of surrounding silica particles form hydrogen bonds with each other and thus a three-dimensional network structure with formation of channels and consequently large diameter gaps (Rapuno e Carmona-Ribeiro, 2000; Leboda *et al.*, 2000; Degusa, 1993).

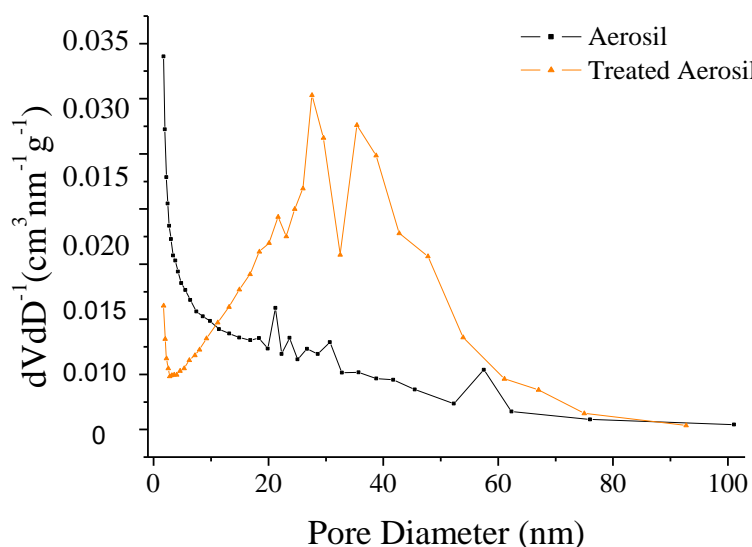


Figure 5: Method BJH in the pore size distribution of the Aerosil®, Aerosil® treated and immobilized biocatalyst by covalente binding (CB) in different the mass ratio.

After covalently immobilizing the Aerosil® onto lipase, it was found that the diameter decreases due to lipase aggregate on the surface and within the three-dimensional network formed by Aerosil® as described in Table 1. It was observed the formation of mesopores, but also macropores. The curves identify the appearance of pores between 20 and 80 nm in the treated Aerosil®. This profile is possibly due to the treatment of Aerosil® and agglomeration with porous structure formation around the lipase.

Table 1: Surface area and pore volume of the silica Aerosil[®] untreated, treated only with APTMS, treated with glutaraldehyde and APTMS and immobilized biocatalysts by covalent binding in different mass ratios.

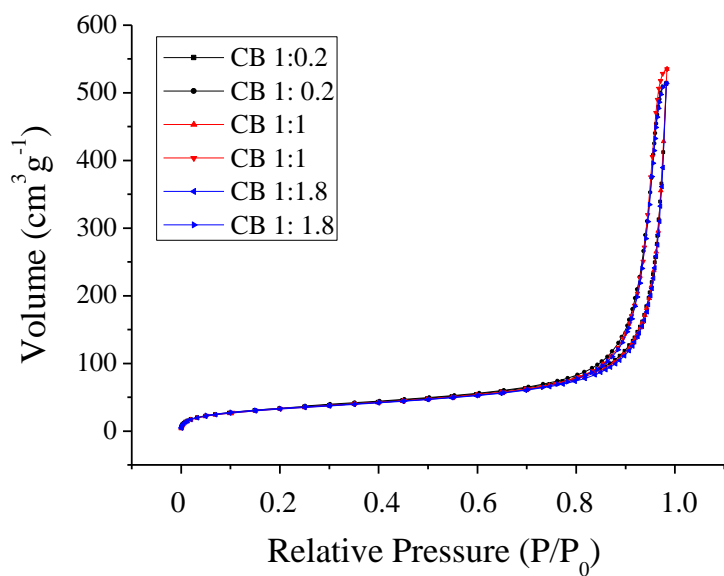
Samples	Surface Area ($\pm 5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Pore Volume ($\pm 0.05 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
Aerosil [®]	174	0.41
Aerosil [®] (APTMS)	136	0.82
Aerosil [®] (APTMS- Glutaraldehyde)	156	0.96
Biocatalyst Immobilized by CB (1:0,2)	119	0.78
Biocatalyst Immobilized by CB (1:1)	120	0.82
Biocatalyst Immobilized by CB (1:1,8)	119	0.79

It was also observed that the comparison of isotherms for the various fractions tested independent of the molar fraction of the textural characteristics remains constant (Figure 6a). The isotherms and pore distributions were identical and allowed the development of a model of immobilization by specific covalent binding to this system. Considering that for this system is obtained immobilized support in the enzyme and not vice versa. In this case, regardless of the added proportion, which is insoluble is only a fraction sufficiently functionalized enzyme whereby there is an interaction between silica nanoparticles and lipase caused by the porosity discussed above, thus achieving a small difference in operational stability independent of the biocatalyst the mass ratio.

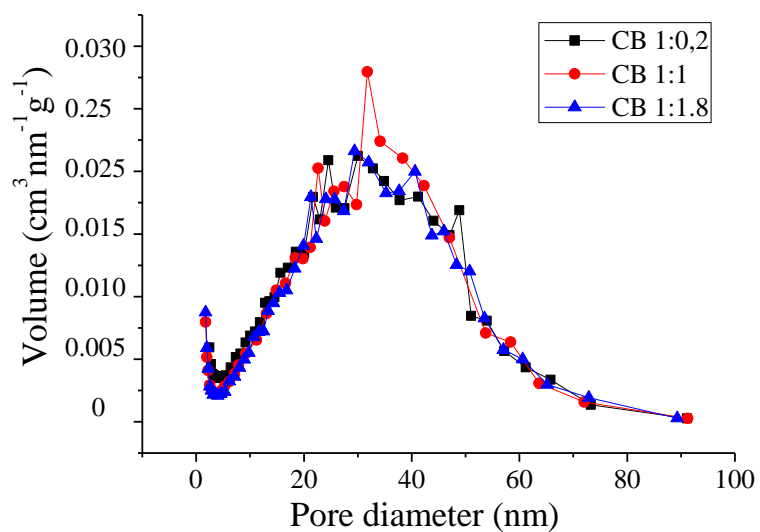
Analyzing the pore distribution of the immobilized lipase Aerosil[®] by different molar ratios as seen in Figure 6b one can see the same profile for the independent pore distribution of the molar ratio, mesopores. According to the IUPAC when the pore diameter is larger than 50 nm are referred to as macropores; when they are less than 2 nm are micropores and intermediate between them (2 nm < pore diameter < 50 nm) are called mesopores.

We can observe in the Table 2 that when biocatalysts immobilized by physical adsorption technique in the presence of the ionic liquid there was an increase in surface area and pore volume, we suggest that the lipase and the ionic liquid is weakly bound to the surface formed by agglomeration and thus Aerosil[®] increasing the area and volume of the pores formed by the aggregates, compared to covalent binding. This result is related to a higher initial

hydrolysis activity when applied physical adsorption technique and reduced operating stability, i.e., the lipase is no attached on the surface Aerosil®.



(a)



(b)

Figure 6: Isotherms (a) and diameter distribution (b) of immobilized biocatalysts by covalent binding in different mass ratios.

The opposite effect to the one described above was observed for immobilization by the covalent binding method with decreasing surface area parameters and pore volume, since the lipase and the ionic liquid possibly bound strongly to agglomerate by means of spacer arm formed by the agent bifunctional in the presence of the ionic liquid.

Table 2: Surface area and pore volume of the Aerosil® immobilized onto lipase from *Burkholderia cepacia* in the presence or absence of ionic liquid.

Samples	Surface Area ($\pm 5 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Pore Volume ($\pm 0.05 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
Physical adsorption with IL	80	0.18
Physical adsorption without IL	112	0.78
Covalente binding without IL	120	0.85
Covalente binding with IL	99	0.77

3.4. Scanning electron microscopy

In the Figure 7a is observed lipase from *Burkholderia cepacia* with a rounded shape (Figura 7a). The Aerosil® supports presents itself in the form of flakes (Figure 7b) and after treatment with APTMS and glutaraldehyde in Figure 7c and 7d, respectively, resulted in a sharp and agglomerated support. In analyzing of Figura 7e, 7f, 7g andh the immobilized biocatalysts, we can see the Aerosil® immobilized onto lipase by physical adsorption, and thus the purpose of this study was confirmed by micrographs, i.e., the support for the lipase has been immobilized, and not the opposite found in normal and literature, where the biocatalyst is immobilized on the support.

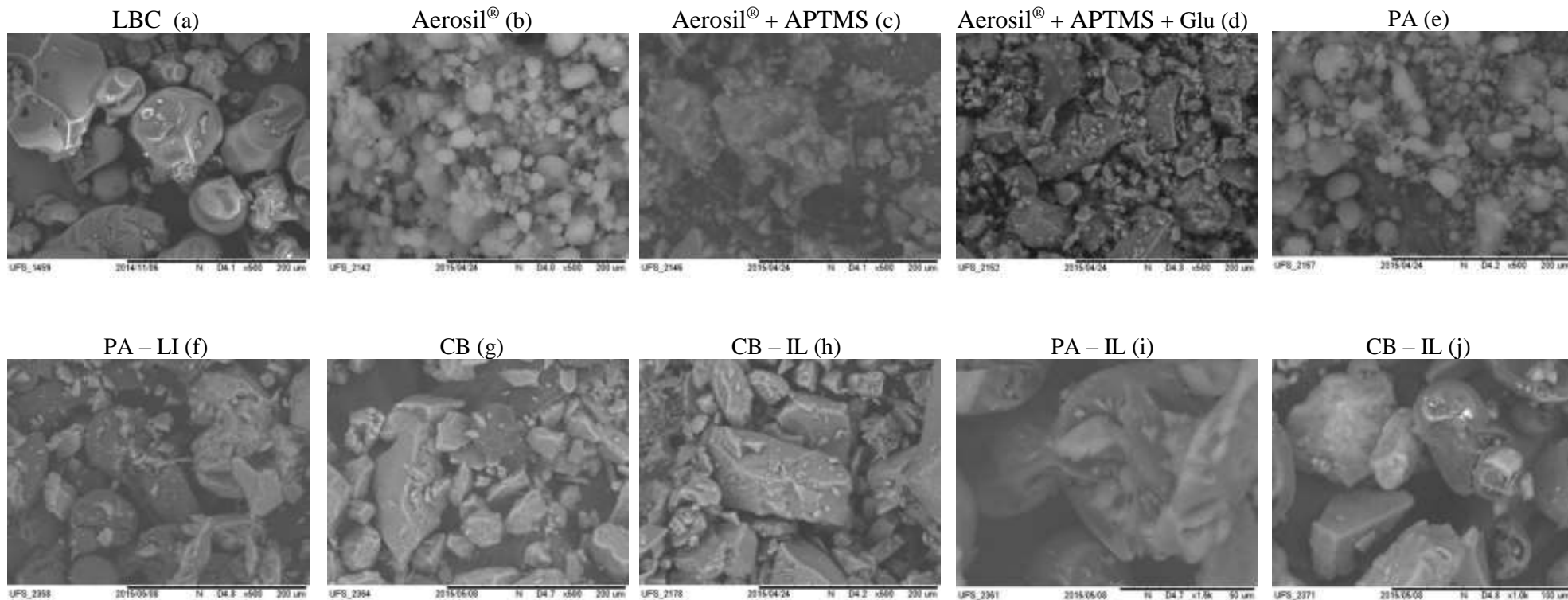


Figure 7: Micrographs of the lipase from *Burkholderia cepacia* (a), Aerosil® (b) Aerosil® treated with APTMS (c) Aerosil® treated with glutaraldehyde and APTMS (d), Aerosil® immobilized onto lipase by physical adsorption without ionic liquid (e), by physical adsorption with ionic liquid (f), by covalent binding without ionic liquid (g) and by covalent binding with ionic liquid (h), by physical adsorption (i) and covalent binding (j) with ionic liquid.

The main difference observed in the micrograph when compared to immobilization methods in the presence of the ionic liquid additive, is that the presence of the ionic liquid immobilized by covalent binding there is a formation of aggregates between particles and surrounding lipases (Figure 7i), which It can not be seen by the method of physical adsorption where there are Aerosil[®] particles of immobilized lipase alone (Figura 7j).

3.5. Fourier transform infrared spectra (FTIR)

The spectra were obtained for lipase from *Burkholderia cepacia* free, the Aerosil, Aerosil[®] treated with APMTS and glutaraldehyde (Figure 8), lipase immobilized by physical adsorption (mass ratio 1: 0.2) with and without ionic liquid, immobilized by covalent binding (mass ratio 1: 0.2) with and without ionic liquid, represented in Figure 9.

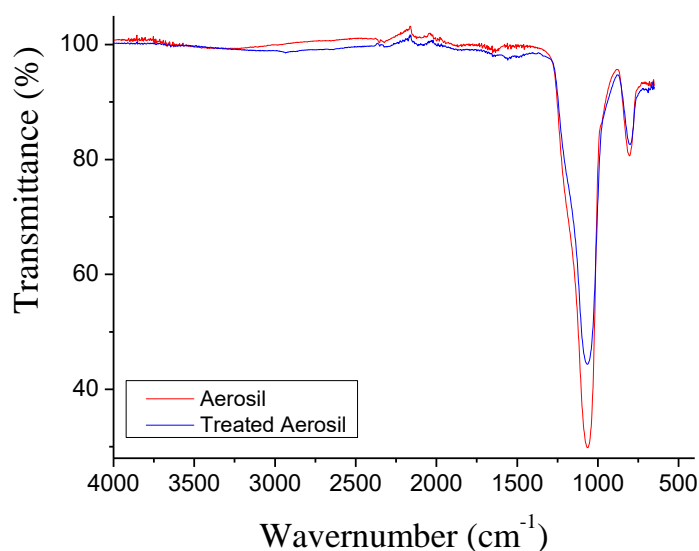


Figure 8: FTIR spectra of the Aerosil[®] and treated Aerosil[®].

For supports and immobilized biocatalysts intensive bands are easily noticeable between 750 cm⁻¹ and 1000 cm⁻¹ originating from stretching vibrations of the Si-O and Si-O-Si (symmetric stretching). Moreover, in the range below 1000 cm⁻¹ a series of signals related to various vibrations of the $\equiv\text{C}-\text{C}\equiv$ group appear (Khdary and Ghanem, 2012).

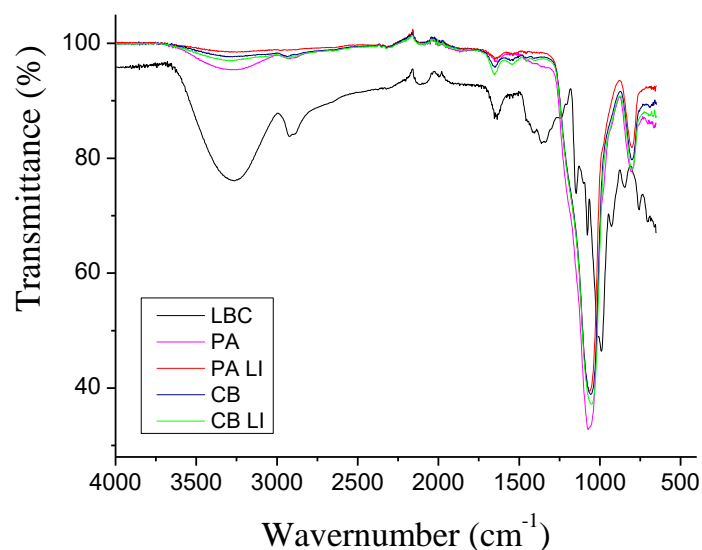


Figure 9: FTIR spectra of the Aerosil[®], treated Aerosil[®], lipase immobilized by physical adsorption with and without ionic liquid, immobilized by covalent binding with and without ionic liquid.

Among these signals, one at a wavenumber around 1600 cm^{-1} originating from stretching vibrations of the C=O, group is particularly distinguishable and amide I represent groups present in the lipase spectrum, and at the lower intensity for them immobilized biocatalysts (Portaccio *et al.*, 2011). According Zdarta and Jesionowski (2013) wide bands are noticeable between 3600 cm^{-1} and 3200 cm^{-1} originating from stretching vibrations of the -OH group, which mask the stretching vibrations band of the -NH group.

4. Conclusion

It was possible to develop a new strategy for immobilization of microporous silica Aerosil[®] onto lipase from *Burkholderia cepacia* with increased operational stability when used the technique of immobilization by covalent binding, the mass ratio 1:0.2. The development of a new, simple and effective procedure an immobilization process opens many possibilities for its use in important catalytic applications. The optimization of the presented method with ionic liquid additive enables also an increase in the enzymatic activity.

References

- AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. *Química Nova*, v. 31, p. 144, 2008.
- ARAKAKI *et al.* Thioglycolic acid grafted onto silica gel and its properties in relation to extracting cations from ethanolic solution determined by calorimetric technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 273, p. 211–217, 2004.
- BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. *Química Nova*, v. 32, p. 1926-1933, 2009.
- CAOVILLA, A.; RIGO, R. T.; PENHA, F. G.; PERGHER, S. B. C. Estudo e caracterização da zeólita OFF Tipo T empregando diferentes fontes de silício. *Química Nova*, v. 32, p. 1818-1821, 2009.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. USO DE SÍLICAS MODIFICADAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES. *Química Nova*, v. 38, p. 399-409, 2015.
- DEGUSA S/A. Basic characteristics of AEROSIL®. Technical Bulletins Fine Particles, 1993.
- DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C., *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, Editora Artliber: São Paulo, 2006.
- HARA, P.; MIKKOLA, J. P.; MURZIN, D. Y.; KANERVA, L. T. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 129–134, 2010.
- HU, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2291–2299, 2012.
- KHALIL, A. M. Thermal treatment of Aerosil 200 silica: induced surface porosity and surface chemistry relative to the heat of immersion in water. *Surface Technology*, v. 14 p. 383 – 390, 1981.

KHDARY, N. H.; GHANEM, M. A. Metal–organic–silica nanocomposites: copper, silver nanoparticles–ethylenediamine–silica gel and their CO₂ adsorption behavior. *Journal of Materials Chemistry*, v. 22, p. 12032-12038, 2012.

LEBODA, R.; SKUBISZEWSKA-ZIE, J.; DABROWSKI, A.; TERTYKH V.A. Effect of aerosil on the hydrothermal modification of porous structure of silica gel adsorbents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 172, p. 69–77, 2000.

MATHIAS, J.; WANNEMACHER, G. Basic Characteristics and Applications of Aerosil. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 125, p. 61-68, 1988.

MOHIDEM N. A.; MAT H. B. Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol–gel silica with additives. *The Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 61, p. 96-103, 2011.

PORTACCIO, M.; VENTURA, B. D.; MITA, D. G.; MANOLOVA, N.; STOILOVA, O.; RASHKOV, I.; LEPORE, M. FT-IR microscopy characterization of sol–gel layers prior and after glucose oxidase immobilization for biosensing applications. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 57, p. 204–211, 2011.

RAPUANO, R.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Supported bilayers on silica. *Journal Colloids Interface Science*, v. 226, 299-307, 2000.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77, p. 745-758, 1999.

SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; Production of ethyl esters and emulsifiers using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase with protic ionic liquid as additives. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 141-50, 2013.

ZDARTA, J.; JESIONOWSKI, T. Amano Lipase A grafting onto a silica surface. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*. v. 94, p. 51-53, 2013.

ZOU, B.; SONG, C.; XU, X.; XIA, J.; HUO, S.; CUI, F. Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials. *Applied Surface Science*, v. 311, p. 62-67, 2014.

ZHURAVLEV, L.T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 173, p. 1–38, 2000.

5. CONCLUSÕES

Conforme a relevância do tema de pesquisa proposto no artigo de revisão publicado como parte desta tese de doutorado e experimentos realizados e também apresentado como artigo para submissão, as principais conclusões são apresentadas a seguir separadamente por artigo:

ARTIGO II:

- As características morfológicas e físico-químicas dos suportes preparados indicaram a influência do LI na modificação da superfície da sílica com o aumento da área superficial e porosidade. O rendimento de imobilização para os biocatalisadores imobilizados por ligação covalente, utilizando o agente bifuncional glutaraldeído, em sílica controle e sílica modificada foram 21 e 23%, respectivamente. Quando utilizado o agente bifuncional epícloridrina o rendimento foi de 203 para 250% para biocatalisadores imobilizados em suporte com líquido iônico prótico.

- Os biocatalisadores imobilizados por ligação covalente com o agente bifuncional epícloridrina e aplicados na reação de hidrólise do azeite de oliva, apresentaram pH ótimo 3.0 e temperatura ótima de 45 °C. Obteve-se a maior velocidade máxima (V_{max}) e menor constante de Michaelis–Menten (K_m) após imobilização por ligação covalente.

- O biocatalisador imobilizado em sílica modificada apresentou maior estabilidade operacional, alcançando 17 ciclos com mais de 50% da sua atividade inicial, diferentemente do biocatalisador imobilizado em sílica controle que atingiu esse valor já no 8º ciclo.

- As micrografias obtidas pela microscopia eletrônica de varredura apresentaram modificações significativas dos biocatalisadores imobilizados em suportes quando produzidos com líquido iônico e utilizado o agente bifuncional epícloridrina; nas análises físico-químicas referentes à perda de massa e espectroscopia de infravermelho e análise da superfície, do diâmetro e volume dos poros foi possível identificar a mudança estrutural por perda de massa

e a modificação da porosidade do suporte após imobilização. O FTIR auxiliou na determinação dos grupamentos aminos confirmando os valores obtidos no RI.

- Para os diferentes óleos (soja, canola e girassol) pode-se considerar que a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por ligação covalente foi eficaz para a reação de transesterificação. A conversão máxima de ésteres etílicos de soja foi de 93% em 72 h para o biocatalisador imobilizado em sílica modifica. Para o óleo de canola atingiu-se 98% no mesmo tempo. Para o óleo de girassol, uma conversão de 92% foi obtida depois de 72 horas quando se utiliza a sílica modificada e 73% para sílica controle.

ARTIGO III

- A modificação do suporte de sílica com líquido iônico proporcionou um aumento no rendimento de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica de adsorção física em 1.94 vezes quando comparada à imobilização em sílica controle. A diferença foi mais expressiva comparado com a técnica de imobilização por ligação covalente que aumentou somente 1.25 vezes o rendimento de imobilização.

- Por meio do planejamento experimental foi possível determinar variáveis significativas da reação de transesterificação para obtenção das máximas conversões em esteres etílicos de girassol de 85% (biocatalisador imobilizado por adsorção física em sílica modificada) e 96% (biocatalisador imobilizado por ligação covalente em sílica modificada): temperatura (40 °C), concentração da enzima (20% m/m) e razão molar óleo:álcool (1:7).

- Os biocatalisadores imobilizados em suportes modificados apresentaram maior tempo de meia-vida quando utilizada a sílica modificada para imobilização da lipase pela técnica de adsorção física (2.8 vezes) e ligação covalente (2.2 vezes) comparada à lipase imobilizada em sílica controle.

- As análises morfológicas e físico-químicas permitiram identificar a presença de LBC nos biocatalisadores imobilizados em suportes de sílica modificados confirmando o maior potencial catalítico na reação de hidrólise e transesterificação realizadas neste estudo.

ARTIGO IV

- Na avaliação da estabilidade operacional do Aerosil® sobre a lipase de *Burkholderia cepacia* a razão mássica lipase:Aerosil® não apresentou diferenças significativas, no terceiro reciclo a atividade alcançou uma perda de 50% comparada a atividade inicial de hidrólise. Para a imobilização pela técnica de ligação covalente na razão mássica lipase: Aerosil® de 1:0.2 até o 9º ciclo a atividade relativa se manteve entre 80 e 100%, alcançando uma redução de 50% no 13º de ciclo.

- Adição de líquido iônico no procedimento de imobilização houve aumento da atividade de hidrólise possivelmente devido à superativação da lipase causada pelo líquido iônico e a estabilidade operacional foi menor quando comparada ao processo sem líquido iônico.

- De acordo com a caracterização da superfície de suporte, o suporte Aerosil® após tratamento com APTMS e glutaraldeído passou de microporoso para mesoporoso e após imobilização pela técnica de ligação covalente nas diferentes razões mássicas apresentaram a mesma distribuição de poros independente da proporção molar.

- Foi possível observar que quando utilizado o líquido iônico no processo de imobilização por adsorção física houve um aumento da área superficial e volume de poros, sugerindo que a lipase e o líquido iônico são fracamente ligados à superfície. Para a técnica de ligação covalente ocorre a diminuição dos parâmetros de área superficial e volume de poros, uma vez que a lipase e o líquido iônico, possivelmente, ocuparam os espaços impedindo a adsorção de nitrogênio.

- As micrografias permitiram a visualização da lipase e dos suportes, bem como a lipase imobilizada nos suportes imobilizados sem líquido iônico e com líquido iônico pelas técnicas de adsorção física e ligação covalente. O FTIR permitiu a avaliação das bandas características da sílica e da lipase, confirmando assim que é possível considerar uma nova estratégia para a imobilização de sílica microporosa Aerosil® sobre a lipase de *Burkholderia cepacia* com estabilidade operacional quando utilizada a técnica de imobilização por ligação covalente na razão mássica 1:0,2.

Portanto, o presente trabalho baseando-se nos quatro artigos propostos evidenciam a influência positiva do líquido iônico prótico na modificação da superfície da sílica produzida pela técnica sol-gel para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* por adsorção física

e ligação covalente e ainda a influencia deste aditivo durante a imobilização da sílica Aerosil®. Conclui-se que modificação da sílica ou imobilização na presença do líquido iônico com aditivo torna-se atrativo para obtenção de suporte e imobilização de biocatalisador com maior rendimento, aplicabilidade e estabilidade operacional e reações, como a reação de hidrólise e transesterificação.

6. PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS

Os resultados apresentados nesta tese na forma de três artigos fortalecem a linha de pesquisa da biocatálise para otimização de suportes e imobilização de lipase, principalmente pelo emprego do líquido iônico como aditivo, revelando possibilidades para novas pesquisas no âmbito de aplicação de biocatalisadores em reações de síntese. Como sugestões para trabalhos futuros, pode-se enumerar:

1. Desenvolver novos biocatalisadores, ou seja, outros tipos de lipases imobilizadas em suporte de sílica modificada produzida pela técnica sol-gel e avaliar o rendimento de imobilização para diferentes métodos;
2. Aplicar o aditivo líquido iônico para modificação de diferentes suportes para imobilização de lipase;
3. Realizar a caracterização bioquímica do biocatalisador imobilizado em sílica Aerosil® e aprofundar os estudos de aplicação do biocatalisador imobilizado em reações de síntese;
4. Aplicar os biocatalisadores imobilizados em suporte de sílica modificada produzida pela técnica sol-gel nas reações de síntese de ésteres etílicos em processo de fluxo contínuo.
5. Realizar experimentos de transesterificação em meios alternativos, como por exemplo, ultrassom e micro-ondas;
6. Após o estabelecimento dessas condições ótimas da reação de transesterificação, complementar o estudo com o escalonamento do processo e análise de viabilidade econômica.

7. TRABALHOS PUBLICADOS

Até o presente momento da tese de doutoramento publicou-se os resultados em periódicos, eventos nacionais e internacionais, conforme descritos abaixo:

- Periódicos:

1. CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. USO DE SÍLICAS MODIFICADAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES. *Quimica Nova*, v. 38, p. 399-409, 2015.

- Trabalhos publicados em eventos internacionais

1. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; MENCONCA, J.; PEREIRA, M. M.; FREITAS, L. S.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Use lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized onto mesoporous silica modified with protic ionic liquid for production ethyl ester. In: 36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Florida, Estados Unidos, 2014.

2. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; PROFESSOR, A. C.; OLIVEIRA, M. V. S.; PEREIRA, M. M.; MATTEDI, S.; FREITAS, L. S. MATTEDI, S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Immobilization of lipase in silica with ionic liquid, characterization and application for the ethyl esters syntheses. In: 12th International Chemical and Biological Engineering Conference (CHEMPOR 2014), Porto, Portugal, 2014.

3. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; MENDONCA, J.; BARBOSA, A. S.; PEREIRA, M. M.; MATTEDI, S.; FREITAS, L. S.; MATTEDI, S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in silica sol-gel modified with protic ionic liquid to produced ethyl esters of sunflower oil. In: 11th Euro Fed Lipid Congress, Montpellier, France, 2014.

4. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T. ; PEREIRA, M. M.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; COUTINHO, J. A. P.; SIERPE-JERALDO, V. L.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Improvement of immobilization process for covalent binding and adsorption of lipase onto hydrophobic matrices using ionic liquid. In: 5th Congress on Ionic Liquids, 2013, Alverage, Portugal, 2013.

5. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; BARBOSA, A. S.; PEREIRA, M. M.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. *Burkholderia cepacia* lipase adsorption immobilization on silica with ionic liquid. In: 9 Encontro Nacional de Catalise e Materiais Porosos, Porto, Portugal, 2013.

6. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; SOUZA, R. L.; PEREIRA, M. M.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.. Production of fatty acids through hydrolysis of olive oil with lipase from *Burkholderia cepacia* encapsulated with ionic liquid. In: 11th Euro Fed Lipid Congress, Antalya, Turquia, 2013.

- Trabalhos publicados em eventos nacionais

1. CARVALHO, N. B.; SIMOES, G. V. S.; PROFESSOR, A. C.; BARBOSA, A. S.; PEREIRA, M. M.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Avaliação dos parâmetros reacionais na transesterificação utilizando lipase imobilizada por adsorção física em sílica modificada com líquido iônico. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Fortaleza, Brasil, 2015.

2. CARVALHO, N. B.; SIMOES, G. V. S.; PROFESSOR, A. C.; BARBOSA, A. S.; PEREIRA, M. M.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Produção de ésteres etílicos a partir de óleo de girassol utilizando lipase imobilizada em sílica modificada com líquido iônico, In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Fortaleza, Brasil, 2015.

3. PROFESSOR, A. C.; CARVALHO, N. B.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Avaliação do potencial de produção de ésteres etílicos a partir do óleo de coco utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos - XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Fortaleza, Brasil, 2015.

4. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; PROFESSOR, A. C.; BARBOSA, A. S. ; PEREIRA, M. M.; FREITAS, L. S.: FRICKS A. T.; MATTEDI, S. LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em sílica mesoporosa modificada com líquido iônico prótico para síntese de ésteres etílicos. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, Brasil, 2014.

5. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; BARBOSA, A. S.; PEREIRA, M. M.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Propriedades morfológicas e físico-químicas da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matrizes hidrofóbicas com líquido iônico. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Foz do Iguaçu, Brasil, 2013.

6. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; PEREIRA, M. M.; OLIVEIRA, M. V. S.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; Síntese e aplicação de lipase imobilizada por diferentes métodos de imobilização em matrizes hidrofóbicas utilizando líquido iônico, In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Foz do Iguaçu, Brasil, 2013.

7. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; PEREIRA, M. M.; FREITAS, L. S.; FRANCESCHI, E.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Modificação de matrizes híbridas na presença do líquido iônico prótico como aditivo para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.. In: I Workshop em Materiais Híbridos Multifuncionais, Porto Alegre, Brasil, 2013.

8. VIDAL, B. T.; MENCONCA, J.; CARVALHO, N. B.; FRICKS, A. T.; FREITAS, L. S.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Preparação e aplicação de biocatalisadores imobilizados. In: 15 Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil, 2013.

9. VIDAL, B. T.; CARVALHO, N. B.; MENCONCA, J.; FREITAS, L. S.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Biotransformação utilizando biocatalisadores imobilizados por adsorção física. In: 15 Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil, 2013.

10. MENDONÇA, J.; CARVALHO, N. B.; CALDAS, E. M.; BENVENUTTI, E. V.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE DO SUPORTE MICROPOROSO AEROSIL[®] SOBRE A LIPASE DE *Burkholderia cepacia*. In: 15 Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil, 2013.

11. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; PEREIRA, M. M.; FREITAS, L. S.; MATTEDI, S.; DURO, M. A. I.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* sobre sílica mesoporosa modificada com líquido iônico prótico e aplicação na reação de hidrólise e transesterificação. In: 15 Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes, 2013, Aracaju, Brasil, 2013

12. VIDAL, B. T.; CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Preparação de biocatalisadores imobilizados em suportes com e sem líquido iônico. In: 14ª Semana de Pesquisa - A internacionalização da ciência no Brasil, 2012, Aracaju, Brasil, 2012.