

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO  
NA BIOCATÁLISE**

Autor: Milson dos Santos Barbosa

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleide Mara Faria Soares

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rebeca Yndira Cabrera Padilla

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2017

APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO NA BIOCATALÍSE

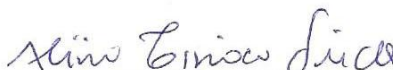
Milson dos Santos Barbosa

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

Aprovada por:



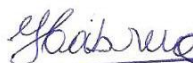
Dr. Adriano Aguiar Mendes  
Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Química  
(Membro externo)



Dr.<sup>a</sup> Alini Tinoco Fricks  
Universidade Tiradentes – PBI/UNIT  
(Membro interno)



Dr. Ranyeré Lucena de Souza  
Universidade Tiradentes – PEP/UNIT  
(Membro interno)



Dr.<sup>a</sup> Rebeca Yndira Cabrera Padilla  
Universidade Tiradentes – PEP/UNIT  
(Co-orientadora)



Dr.<sup>a</sup> Cleide Mara Faria Soares  
Universidade Tiradentes – PEP/UNIT  
(Orientadora)

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2017

B238a      Barbosa, Milson dos Santos  
Aplicação de líquidos iônicos à base de fosfônio na biocatálise. / Milson dos Santos Barbosa; orientação [de] Profª. Drª. Cleide Mara Faria Soares, Profª. Drª. Rebeca Yndira Cabrera Padilha. – Aracaju: UNIT, 2017.

86 p: il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo) - Universidade Tiradentes, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Líquidos iônicos à base de fosfônio. 2. Lipase *Burkholderia cepacia*. 3. Imobilização de enzimas. 4. Adsorção física. 5. Biocatálise. I. Soares, Cleide Mara. (orient.). II. Padilla, Rebeca Yndira Cabrera. (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 624

*"Quero que vocês entendam que o melhor que a gente pode ter na vida são as coisas básicas: é a nossa saúde, é a família, é um amigo, é um lugar para viver... É ter no que acreditar, é viver em função de um sonho. Eu tenho uma alma que é feita de sonhos..."*

***Alexandre Magno Abrão - Chorão***

## *Agradecimentos*

À Deus, meu criador, por tudo que tenho, por ser a razão da fé que me guia e por colocar as melhores pessoas do mundo no meu caminho.

*“Porque Deus sabe de todas as coisas, sempre. Ele sabe todos os meus sonhos, pois foi Ele que me deu. Ele jamais me daria um sonho que eu não pudesse realizar”.*

À toda minha família pelo amor incondicional, suporte e compreensão diante de toda ausência e ansiedade durante a elaboração deste trabalho. Em especial, à minha mãe Luzinete, ao meu pai José Milton, aos meus irmãos Milton e Mariane, à Bibi, aos meus avós maternos (Valdete e Sírio - *in memoriam*) e paternos (Valdelice e Henrique), a todas as tias, tios, primas e primos.

As minhas orientadoras Cleide e Rebeca, por confiar no meu trabalho, pelo constante incentivo, sabedoria, compreensão e disposição em orientar e ensinar, sempre indicando as melhores decisões a serem tomadas. À Cintia, por todo suporte e apoio durante o desenvolvimento do projeto. Aos professores Álvaro, Ranyere, Aline, Adriano, Nayara e Mara por toda contribuição e por fazerem parte do meu crescimento profissional.

Aos amigos que compartilham diariamente dos mesmos desafios, nomeadamente à Isabelle, Cliff, Maria Rosa e Débora. Aos colegas do PEP e do LPA/LEB por me ajudarem sempre que possível, e por todos os ensinamentos.

Aos meus verdadeiros amigos de sempre, por toda consideração, mesmo sem o convívio diário. Em especial ao Alysson, Adyson, Vinícius, Marcos, Robson, Luiz Paulo, Andreia, Vivian, Talita, Bony, Leila, Elayne, Elis e Adélia.

Ao PEP/UNIT, ao CICECO, à CAPES/CNPq e ao Sci-Hub por todo apoio durante mestrado.

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

## APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO NA BIOCATALÍSE

Milson dos Santos Barbosa

Líquidos iônicos (LIs) têm atraído cada vez mais o interesse acadêmico e industrial devido às suas excelentes propriedades, tais como pressão de vapor negligenciável a depender do tipo, não inflamabilidade, elevada estabilidade química e térmica, assim como alta capacidade de manipular suas propriedades, por meio da combinação de diferentes cátions e ânions, para atender requisitos para aplicações específicas. Os líquidos iônicos à base de fosfônio (LIFs) são produzidos por meio da quaternização de um alquil fosfina com um análogo alcano, e estão comercialmente disponíveis desde 2008. Em algumas aplicações, os LIFs apresentam propriedades mais atrativas que LIs à base de imidazólio e piridínio, tais como estabilidade mais elevada e menor viscosidade. O uso combinado de líquidos iônicos para o aperfeiçoamento de biocatalisadores imobilizados tem recebido destaque nos últimos anos, entretanto, são raros os relatos na literatura sobre o uso de LIFs na biocatálise. Neste contexto, com interesse de obter novas alternativas para o desenvolvimento sustentável e eficiente de biocatalisadores imobilizados, este trabalho avaliou os efeitos da aplicação de sete líquidos iônicos à base de fosfônio com diferentes comprimentos de cadeias catiônicas ( $[P_{4444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  e  $[P_{666(14)}]^+$ ) e distintos ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ) na biocatálise, em três distintas etapas: na atividade de lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) (Etapa 1); na modificação superficial da sílica (Etapa 2); e na atividade da LBC imobilizada por adsorção física em sílica (Etapa 3). Os resultados mostraram que o aumento no comprimento da cadeia catiônica dos LIFs promoveu a diminuição 86% e 50% na atividade da LBC, quando os mesmos foram aplicados nas etapas 1 e 3, respectivamente. No entanto, quando estes LIFs foram aplicados na modificação da sílica (Etapa 2), observou-se que os LIFs com cadeias catiônicas mais longas causaram menores efeitos negativos sobre a atividade da LBC imobilizada. Em relação ao efeito do uso de LIFs com mesmo cátion e diferentes ânions, notou-se tendências semelhantes nas três etapas, com efeitos positivos (aumento da atividade enzimática) quando se selecionou LIFs com ânions mais hidrofóbicos. Em geral, o LIF de natureza mais hidrofóbica ( $[P_{666(14)}]NTf_2$ ) promoveu maior acréscimo na atividade relativa da LBC em todas as etapas, com aumento de 37,6% para a LBC livre, incremento de 109,8% quando aplicado na modificação da sílica, e com influência mais acentuada (222,7%) quando o mesmo foi adicionado durante o processo de imobilização da enzima por adsorção física. Os efeitos da melhoria nas propriedades dos suportes e biocatalisadores imobilizados foram comprovados a partir das caracterizações morfológicas e físico-químicas.

Palavras-chave: Líquidos iônicos à base de fosfônio, lipase *Burkholderia cepacia*, imobilização de enzimas, adsorção física, biocatálise.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

## APPLICATION OF PHOSPHONIUM-BASED IONIC LIQUIDS ON BIOCATALYSIS

Milson dos Santos Barbosa

Ionic liquids (ILs) have increasingly attracted both academic and industrial interest because of their excellent properties, such as negligible vapor pressure depending on the type, non-flammability, high chemical and thermal stabilities, as well as high capacity to manipulate their properties, through the combination of different cations and anions, to meet requirements of specific applications. Phosphonium-based ionic liquids (PILs) are produced by quaternizing of alkyl phosphines, with an alkane analog and have been commercially available since 2008. In some applications, PILs have more attractive properties than imidazolium and pyridinium based ILs, such as higher stability and lower viscosity. The combined use of ionic liquids for the improvement of immobilized biocatalysts has been highlighted in recent years, however, there are few reports in the literature about the application of PILs in biocatalysis. In this context, with the interest of obtaining new alternatives for the sustainable and efficient development of immobilized biocatalysts, this work evaluated the effects of the application of seven phosphonium-based ionic liquids with different lengths of cationic chains ( $[P_{4444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  and  $[P_{666(14)}]^+$ ) and different anions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  and  $[NTf_2]^-$ ) in biocatalysis, in three distinct steps: in the activity of free *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) (Step 1); in the surface modification of silica (Step 2); and finally, in the activity of immobilized BCL by physical adsorption in silica (Step 3). The results showed that the increase in the length of cationic chain of PILs caused a decrease in the activity of BCL when they were applied in the steps 1 and 3. However, when these PILs were applied in silica modification (Step 2), it was observed that PILs with longer cationic chains caused less negative effects on the immobilized the BCL activity. Regarding to the effect of PILs with same cation and different anions, similar trends were observed in the three steps, with positive effects (increase of the enzymatic activity) when PILs synthesized with more hydrophobic anions were selected. In general, PIL of a more hydrophobic nature ( $[P_{666(14)}]NTf_2$ ) presented a greater increase in the relative activity of the BCL at all stages, with an increase of 37.6% for free BCL, an increase of 109.8% when it was applied to the silica modification, and with more pronounced influence (222.7%) when it was added during the immobilization process of the enzyme by physical adsorption. The effects on the improvement in the properties of the supports and immobilized biocatalysts have been proven from the morphological and physico-chemical characterization.

Keywords: Phosphonium-based ionic liquids, *Burkholderia cepacia* lipase, immobilization of enzymes, physical adsorption, biocatalysis.

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1         |
| <b>CAPÍTULO 2</b> .....   | <b>4</b>  |
| 2. OBJETIVOS .....  | 4         |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....   | 4         |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 4         |
| <b>CAPÍTULO 3</b> .....   | <b>5</b>  |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 5         |
| 3.1. LÍQUIDOS IÔNICOS .....   | 5         |
| 3.1.1. Líquidos iônicos à base de fosfônio .....  | 8         |
| 3.2. ENZIMAS E LÍQUIDOS IÔNICOS .....   | 9         |
| 3.2.1. Lipase <i>Burkholderia cepacia</i> .....   | 11        |
| 3.2.2. Líquidos iônicos como ativadores/inativadores de enzimas .....                                     | 14        |
| 3.3. BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS .....  | 18        |
| 3.3.1. Adsorção física .....  | 20        |
| 3.3.2. Líquidos iônicos como aditivos durante a imobilização de enzimas .....                             | 21        |
| 3.4. SÍLICA E AGENTES MODIFICADORES .....   | 24        |
| 3.4.1. Líquidos iônicos como agentes modificadores de sílica .....  | 26        |
| <b>CAPÍTULO 4</b> .....   | <b>28</b> |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....  | 28        |
| 4.1. MATERIAIS .....  | 28        |
| 4.1.1. Enzima .....   | 28        |
| 4.1.2. Líquidos iônicos .....   | 28        |
| 4.2. MÉTODOS .....  | 29        |
| 4.2.1. Atividade de hidrólise no azeite de oliva .....  | 29        |
| 4.2.2. Sílica produzida pela técnica sol-gel .....  | 30        |
| 4.2.3. Imobilização por adsorção física .....   | 31        |
| 4.2.4. Rendimento de imobilização .....   | 32        |
| 4.3. CARACTERIZAÇÕES .....  | 32        |
| 4.3.1. Caracterização morfológica .....   | 32        |
| 4.3.2. Caracterização físico-química .....  | 33        |
| <b>CAPÍTULO 5</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>35</b> |
| 5.1. EFEITOS DOS LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO NA LIPASE<br><i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> LIVRE ..... | 35        |



|   |           |
|---|-----------|
| 5.1.1. Efeito do comprimento da cadeia catiônica na atividade da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> livre .....     | 35        |
| 5.1.2. Efeito do ânion na atividade da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> livre.....                                | 37        |
| 5.2. EFEITOS DOS LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO COMO AGENTES DE MODIFICAÇÃO DA SÍLICA.....                     | 38        |
| 5.2.1. Efeito do comprimento da cadeia catiônica na modificação superficial da sílica ..                            | 39        |
| 5.2.2. Efeito do ânion na modificação superficial da sílica.....  | 40        |
| 5.2.3. Caracterização morfológica.....  | 41        |
| 5.2.4. Caracterização físico-química .....  | 44        |
| 5.3. EFEITOS DOS LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO COMO ADITIVOS DURANTE A IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO FÍSICA ..... | 47        |
| 5.3.1. Efeito do comprimento da cadeia catiônica na imobilização por adsorção física                                | 47        |
| 5.3.2. Efeito do ânion na imobilização por adsorção física.....   | 48        |
| 5.3.3. Caracterização morfológica.....  | 50        |
| 5.3.4. Caracterização físico-química .....  | 51        |
| 5.4. COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO NAS DIFERENTES ETAPAS .....         | 53        |
| 5.4.1. Efeitos do comprimento da cadeia catiônica nas diferentes etapas .....                                       | 53        |
| 5.4.2. Efeito do ânion nas diferentes etapas .....  | 55        |
| <b>CAPÍTULO 6.....</b>  | <b>57</b> |
| 6. CONCLUSÃO.....   | 57        |
| <b>CAPÍTULO 7.....</b>  | <b>58</b> |
| 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....  | 58        |
| <b>CAPÍTULO 8.....</b>  | <b>59</b> |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 59        |
| <b>ANEXO A.....</b>   | <b>72</b> |
| TRABALHOS EXPOSTOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS .....   | 72        |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Cátion fosfônio e exemplos de ânions que podem ser emparelhados para produzir líquidos iônicos à base de fosfônio.....  | 9  |
| <b>Figura 2:</b> Quantidade por ano de artigos publicados e as citações associadas às palavras-chave “ionic liquid” e “enzyme” no site <i>web of science</i> , entre os anos de 2000 e 2016. ....  | 11 |
| <b>Figura 3:</b> Representação da estrutura tridimensional da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . ....   | 12 |
| <b>Figura 4:</b> Representação das mudanças conformacionais que ocorrem na lipase <i>Burkholderia cepacia</i> . A região da tampa é representada em vermelho e a região em azul indica o subdomínio. A tríade catalítica e os resíduos de aminoácidos são ilustrados em amarelo. (A) Estrutura da LBC com a tampa na conformação aberta (B) Estrutura com tampa na conformação fechada. .... | 13 |
| <b>Figura 5:</b> Ilustração das interações entre líquidos iônicos hidrofóbicos (ânions cosmotrópicos e cátions caotrópicos) e hidrofílicos (ânions caotrópicos e cátions cosmotrópicos) e a lipase <i>Burkholderia cepacia</i> . ....  | 16 |
| <b>Figura 6:</b> Principais parâmetros relacionados a enzima, suporte e tipo de ligação para obtenção de uma imobilização eficiente. ....  | 19 |
| <b>Figura 7:</b> Estrutura da sílica e grupamentos presentes. ....   | 25 |
| <b>Figura 8:</b> Líquidos iônicos à base de fosfônio utilizados neste estudo. ....   | 29 |
| <b>Figura 9:</b> Metodologia de rendimento de imobilização e atividade de hidrólise em azeite de oliva. ....   | 30 |
| <b>Figura 10:</b> Metodologia da produção da sílica pela técnica sol-gel. ....   | 31 |
| <b>Figura 11:</b> Metodologia do processo de imobilização por adsorção física. ....  | 32 |
| <b>Figura 12:</b> Atividade relativa da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo ânion $[Cl]^-$ com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ , $[P_{444(14)}]^+$ e $[P_{666(14)}]^+$ ). ....   | 36 |
| <b>Figura 13:</b> Atividade relativa da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo cátion $[P_{666(14)}]^+$ com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ , $[Br]^-$ , $[Deca]^-$ , $[Phosp]^-$ e $[NTf_2]^-$ ). ....   | 37 |
| <b>Figura 14:</b> Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em sílica controle e modificada com líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo ânion $[Cl]^-$ com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ , $[P_{444(14)}]^+$ e $[P_{666(14)}]^+$ ). ....   | 39 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 15:</b> Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em sílica controle e modificada com líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo cátion $[P_{666(14)}]^+$ com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ , $[Br]^-$ , $[Deca]^-$ , $[Phosp]^-$ e $[NTf_2]^-$ ). .....   | 40 |
| <b>Figura 16:</b> Microscopia eletrônica de varredura para: (A) Sílica controle (x200), (B) Biocatalisador imobilizado com sílica controle (x200), (C) Sílica modificada com $[P_{666(14)}]NTf_2$ (x200), e (D) Biocatalisador imobilizado com sílica modificada com $[P_{666(14)}]NTf_2$ (x200)...   | 43 |
| <b>Figura 17:</b> Espectros de FTIR da LBC, dos suportes de sílica controle e sílica modificada com $[P_{666(14)}]NTf_2$ , e dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física.....   | 46 |
| <b>Figura 18:</b> Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em sílica controle na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo ânion $[Cl]^-$ com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ , $[P_{444(14)}]^+$ e $[P_{666(14)}]^+$ ). .....   | 48 |
| <b>Figura 19:</b> Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em sílica controle na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo cátion $[P_{666(14)}]^+$ com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ , $[Br]^-$ , $[Deca]^-$ , $[Phosp]^-$ e $[NTf_2]^-$ ). .....   | 49 |
| <b>Figura 20:</b> Microscopia eletrônica de varredura para: (A) ADS-Control (x200), (B) ADS- $[P_{666(14)}]NTf_2$ (x200). .....   | 51 |
| <b>Figura 21:</b> Espectros de FTIR da LBC, dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física (ADS-Control e ADS- $[P_{666(14)}]NTf_2$ ).....   | 53 |
| <b>Figura 22:</b> Efeitos de LIFs de mesmo ânion $[Cl]^-$ com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ , $[P_{444(14)}]^+$ e $[P_{666(14)}]^+$ ) na atividade relativa (Etapa 1, Etapa 2 e Etapa 3) e rendimento de imobilização (Etapa 2 e Etapa 3) da LBC na hidrólise de azeite de oliva. Efeitos de LIFs em LBC livre (Etapa 1), na modificação superficial de sílica (Etapa 2), e adicionados durante a imobilização da LBC por adsorção física (Etapa 3). ..... | 54 |
| <b>Figura 23:</b> Efeitos de LIFs de mesmo cátion $[P_{666(14)}]^+$ com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ , $[Br]^-$ , $[Deca]^-$ , $[Phosp]^-$ e $[NTf_2]^-$ ) na atividade relativa (Etapa 1, Etapa 2 e Etapa 3) e rendimento de imobilização (Etapa 2 e Etapa 3) da LBC na hidrólise de azeite de oliva. Efeitos de LIFs em LBC livre (Etapa 1), na modificação superficial de sílica (Etapa 2), e adicionados durante a imobilização da LBC por adsorção física (Etapa 3). .....           | 55 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Aplicação de líquidos iônicos como ativadores/inativadores de enzimas.....  | 15 |
| <b>Tabela 2:</b> Vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas. ....  | 20 |
| <b>Tabela 3:</b> Aplicação de adsorção física para imobilização de lipases em diferentes suportes.   | 21 |
| <b>Tabela 4:</b> Aplicação de líquidos iônicos como aditivos na imobilização de enzimas.....   | 23 |
| <b>Tabela 5:</b> Aplicação de líquidos iônicos como agentes modificadores de sílica.....   | 27 |
| <b>Tabela 6:</b> Área superficial, volume de poros e diâmetro de poros da sílica controle e modificada com [P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> e dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física. .... | 42 |
| <b>Tabela 7:</b> Perda de massa parcial e total da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> , da sílica controle e modificada com [P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> e dos biocatalisadores imobilizados. ....    | 45 |
| <b>Tabela 8:</b> Área superficial, volume de poros e diâmetro de poros dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física (ADS-Controlle e ADS-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> ). ....                | 50 |
| <b>Tabela 9:</b> Perda de massa parcial e total dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física (ADS-Controlle e ADS-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> ). ....                                       | 51 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- [Br]<sup>-</sup>: Ânion brometo
- [Cl]<sup>-</sup>: Ânion cloreto
- [Deca]<sup>-</sup>: Ânion decanoato
- [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup>: Ânion bis(trifluorometilsulfonyl)amida
- [P<sub>444</sub>(14)]<sup>+</sup>: Cátion tributiltetradecilfosfônio
- [P<sub>444</sub>(14)Cl]: Cloreto de tributiltetradecilfosfônio
- [P<sub>444</sub>]<sup>+</sup>: Cátion tetrabutilfosfônio
- [P<sub>444</sub>]Cl: Cloreto de tetrabutilfosfônio
- [P<sub>666</sub>(14)]<sup>+</sup>: Cátion trihexiltetradecilfosfônio
- [P<sub>666</sub>(14)Br]: Brometo de trihexiltetradecilfosfônio
- [P<sub>666</sub>(14)Cl]: Cloreto de trihexiltetradecilfosfônio
- [P<sub>666</sub>(14)Deca]: Decanoato de trihexiltetradecilfosfônio
- [P<sub>666</sub>(14)NTf<sub>2</sub>]: Bis(trifluorometilsulfonyl)amida de trihexiltetradecilfosfônio
- [P<sub>666</sub>(14)Phosp]: Fosfinato de trihexiltetradecilfosfônio
- [Phosp]<sup>-</sup>: Ânion fosfinato
- ACS: Reagentes, Solventes e Sais Grau PA
- ADS: Adsorção física
- BET: Brunauer-Emmett-Teller
- BI: Biocatalisador imobilizado
- BJH: Barrett-Joyner-Halenda
- C: Carbono
- CLEA: Imobilização por agregação/reticulação (Cross-linked Enzyme Aggregates)
- CTAB: Tensioativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio
- D<sub>p</sub>: Diâmetro de poro
- DTA: Análise Térmica Diferencial
- DTG: Termogravimetria Derivada
- EC: Enzyme Commission
- FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
- H: Hidrogênio
- IUB: International Union of Biochemistry

**K:** Kelvin  
**kDa:** Kilodalton  
**KF:** Karl Fischer  
**KOH:** Hidróxido de potássio  
**LBC:** Lipase *Burkholderia cepacia*  
**LI:** Líquido iônico  
**LIF:** Líquido iônico à base de fosfônio  
**M:** Molaridade  
**MEV:** Microscopia eletrônica de varredura  
**N:** Nitrogênio  
**N:** Normalidade  
**N<sub>2</sub>:** Nitrogênio líquido  
**O:** Oxigênio  
**OH:** Hidroxila  
**PEG:** Polietilenoglicol  
**PHBV:** Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)  
**PVA:** Álcool polivinílico  
**RI:** Rendimento de imobilização  
**SBA-15:** Sílica comercial  
**SiO<sub>2</sub>:** Sílica  
**SiO<sub>4</sub>:** Silício  
**Si-OH:** Silanol  
**Si-O-Si:** Siloxino  
**TEOS:** Tetraetilortosilicato  
**TG:** Termogravimetria  
**U:** Unidade  
**U<sub>o</sub>:** Unidade de atividade hidrolítica oferecida  
**U<sub>s</sub>:** Atividade hidrolítica  
**UV:** Ultravioleta  
**V<sub>A</sub>:** Volume de amostra  
**V<sub>B</sub>:** Volume de branco  
**V<sub>p</sub>:** Volume de poro

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

O grande desafio para a indústria química e afins no século XXI é encontrar alternativas viáveis para diminuir a dependência do uso de solventes orgânicos tradicionais. Estes podem promover efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente, combinado com a insegurança devido ao seu alto potencial de inflamabilidade e volatilidade (SHELDON, 2016). A mudança de paradigmas é a base da “*Green Chemistry*” ou Química Verde, que visa a redução do impacto da atividade química, por meio do desenvolvimento e aplicação de processos e produtos químicos mais limpos. Com o intuito de reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas para a saúde humana e para o ambiente (ANASTAS e EGHBALI *et al.*, 2010; NEWMAN e JENSEN, 2013).

Uma excelente alternativa verde é a biocatálise, visto que permite substituir processos tradicionais por meio da utilização de enzimas em reações catalíticas. Estes biocatalisadores possuem elevado potencial catalítico e características específicas, com destaque para a possibilidade de realizar processos com baixo consumo de energia e condições reacionais suaves (BON *et al.*, 2008; STRAATHOF *et al.*, 2013). Além disso, as enzimas apresentam facilidade de produção a partir de recursos renováveis e biodegradáveis, apresentando-se com uma valiosa ferramenta para tecnologias ambientalmente amigáveis. Portanto, o grande potencial biotecnológico das reações enzimáticas e o desenvolvimento de novos processos podem maximizar a produção, minimizar os custos e gerar menos resíduos (ALPTEKIN *et al.*, 2011; ARMENTA *et al.*, 2015).

Devido à fácil obtenção, alta seletividade e especificidade, as lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) aparecem como um dos principais biocatalisadores utilizados em diversas áreas industriais, tais como, alimentos, bebidas, couro, tratamento de efluentes, biodiesel, oleoquímica, detergente, papel e celulose, têxtil, cosméticos e farmacêutica (HASAN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2012). No entanto, para ser economicamente viável e produzido em larga escala, é imprescindível que este biocatalisador seja estável, reutilizável e eficiente quando aplicado em processos contínuos, o que é limitado para enzimas solúveis. Para solucionar esse problema, a imobilização de enzimas em suportes sólidos surge como a principal alternativa, a fim de promover maior estabilidade operacional e

facilidade de armazenamento e manuseio do biocatalisador, além da possibilidade de reutilização, reciclagem, processamento contínuo (LIESE e HILTERHAUS, 2013). De uma forma geral, as enzimas são imobilizadas em materiais sólidos chamados de suportes. Uma ampla gama de suportes é aplicada para a imobilização de enzimas, a exemplo dos materiais orgânicos, inorgânicos e híbridos (CARVALHO *et al.*, 2015). Os suportes inorgânicos são os mais utilizados e, entre estes, a sílica produzida por meio da técnica sol-gel se destaca por oferecer a possibilidade de modificação da sua superfície e apresentar boa estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica (VILAR *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2015).

Com o intuito de tornar mais eficiente o processo de imobilização, estudos são relatados tanto para o uso de aditivos como estabilizadores de enzimas quanto para o aperfeiçoamento dos materiais utilizados como suportes (ZOU *et al.*, 2014). O emprego de líquidos iônicos (LIs) para o aprimoramento de biocatalisadores imobilizados vem ganhando cada vez mais destaque na biocatálise (COWAN *et al.*, 2016). Os líquidos iônicos são um grupo de sais orgânicos que geralmente se apresentam no estado líquido em temperaturas abaixo de 100°C. As suas atrativas propriedades físico-químicas, tais como pressão de vapor insignificante, não inflamabilidade e elevada estabilidade química e térmica, apontam os LIs como “solventes verdes” (SEDDON, 1997; BARANYAI *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2014). Por esta razão, os líquidos iônicos têm ganhado amplo reconhecimento como potenciais substitutos aos solventes orgânicos voláteis convencionais utilizados em processos químicos, com o diferencial de que estes podem ser sintetizados com diferentes combinações de cátions e ânions de modo a atender as necessidades de uma aplicação específica (FUKAYA e OHNO, 2013; BUBALO *et al.*, 2015).

A literatura relata que enzimas na presença de LIs apresentam maior atividade catalítica, mas os efeitos também podem ser negativos, dependendo das características do LI e da estrutura da enzima (NORDWALD e KAAR, 2013; MATSUBARA *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, estudos recentes sugerem o uso de LIs como agentes modificadores de suportes e os resultados mostram que a modificação superficial do material promovida pelo líquido iônico pode favorecer a fixação do biocatalisador no suporte, por meio do aumento da área superficial, volume e tamanho dos poros do material (HU *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013; ZOU *et al.*, 2014). Além disso, os líquidos iônicos também têm ganhado grande destaque como aditivos adicionados durante o processo de imobilização, com efeitos consideravelmente positivos tanto em relação às modificações estruturais nos suportes, quanto ao aumento da atividade



enzimática, com conseqüente acréscimo no rendimento de imobilização e estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados na presença de LIs (ZARCULA *et al.*, 2010; VILA-REAL *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013; CABRERA-PADILLA *et al.*, 2015).

Os líquidos iônicos à base de fosfônio (LIFs) estão comercialmente disponíveis desde 2008 e, em algumas aplicações, apresentam propriedades mais atraentes quando comparados com LIs mais comuns, tais como menor viscosidade e maior estabilidade (DEL SESTO *et al.*, 2005; COWAN *et al.*, 2016). No entanto, são raros os relatos na literatura a respeito da aplicação de LIFs na biocatálise, em especial na imobilização de enzimas. O que desperta a necessidade de obtenção de resultados mais consistentes no que diz respeito aos fatores que podem influenciar a atividade enzimática e o processo de imobilização na presença de líquidos iônicos (ZHAO *et al.*, 2015). Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar o uso de líquidos iônicos à base de fosfônio com distintos tamanhos de cadeias catiônica e características hidrofóbicas ou hidrofílicas em três diferentes etapas: na primeira etapa (Etapa 1) foram estudados os efeitos dos LIFs na atividade da lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) livre; na segunda etapa (Etapa 2) foi avaliada a influência dos LIFs na modificação superficial da sílica produzida pela técnica sol-gel utilizada para a imobilização por adsorção física da LBC; e na terceira etapa (Etapa 3) foi verificada a atuação dos LIFs adicionados durante o processo de imobilização da LBC por adsorção física. A fim de avaliar os efeitos na atividade catalítica dos biocatalisadores livres e imobilizados na hidrólise do azeite de oliva.

# Capítulo 2

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de líquidos iônicos à base de fosfônio no comportamento da lipase *Burkholderia cepacia* livre, na modificação superficial de sílica utilizada para a imobilização da LBC por adsorção física e durante o processo de imobilização da lipase por adsorção física.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos dos líquidos iônicos à base de fosfônio na atividade hidrolítica da lipase *Burkholderia cepacia* livre na reação de hidrólise do azeite de oliva;
- Preparar e avaliar a influência da adição dos líquidos iônicos à base de fosfônio na modificação superficial da sílica produzida pela técnica sol-gel utilizada no processo de imobilização por adsorção física da lipase *Burkholderia cepacia*;
- Preparar e verificar a influência da adição dos líquidos iônicos à base de fosfônio durante o processo de imobilização por adsorção física da lipase *Burkholderia cepacia*;
- Realizar as caracterizações físico-química e morfológica dos suportes e biocatalisadores imobilizados.

# Capítulo 3

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentado um breve estado da arte referente ao uso de líquidos iônicos na biocatálise, a partir dos seguintes tópicos: líquidos iônicos, líquidos iônicos à base de fosfônio, enzimas e líquidos iônicos, líquidos iônicos como ativadores/inativadores de enzimas, biocatalisadores imobilizados, líquidos iônicos como aditivos durante o processo de imobilização, sílica e agentes modificadores, e líquidos iônicos como agentes modificadores de sílica.

### 3.1. LÍQUIDOS IÔNICOS

Os solventes convencionais são utilizados diariamente em numerosos processos e, estima-se que eles sejam responsáveis por cerca de 60% de todas as emissões de poluentes oriundos do setor industrial (ANASTAS e EGHBALI *et al.*, 2010). Como o uso de solventes é inevitável, duas principais estratégias para o desenvolvimento de processos mais limpos foram propostas: a substituição de solventes derivados do petróleo por solventes a partir de recursos renováveis, e a substituição de solventes perigosos por outros que apresentam melhores propriedades ambientais, de saúde e de segurança (CEVASCO *et al.*, 2014; BUBALO *et al.*, 2015).

Os líquidos iônicos (LIs) são sais fundidos, conhecidos com uma nova classe de substâncias químicas compostas exclusivamente por íons que está sendo amplamente estudada, aplicada e reconhecida como alternativa promissora na substituição de compostos voláteis na indústria (HUSSEY, 1988; FREIRE *et al.*, 2012). Os LIs são geralmente compostos por cátions orgânicos relativamente grandes e ânions menores que podem ser orgânicos ou inorgânicos. O fato de possuir íons de elevadas dimensões faz com que os líquidos iônicos apresentem uma baixa energia de rede, isto é, não possuem uma estrutura cristalina bem definida, o que confere para a maioria dos LIs estar no estado líquido à temperatura ambiente ou próximo. Ademais, a ausência de uma estrutura cristalina ordenada promove baixos pontos de fusão a maioria dos LIs, que normalmente estão abaixo de 100°C (REBELO *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2009).

De modo geral, a assimetria do cátion é responsável pelas baixas temperaturas de fusão dos LIs, enquanto a natureza do ânion é considerada a principal responsável pela maior parte das suas outras propriedades físicas, tais como densidade e solubilidade (MACFARLANE *et al.*, 2007). Devido à possibilidade de manipular livremente as suas características, combinando os cátions e ânions de mais de um milhão de formas diferentes para atender os requisitos de aplicações específicas, eles são considerados "*designer solvents*" (DEETLEFS e SEDDON, 2010). Contudo, além da sua ampla versatilidade quando comparada com solventes convencionais, os LIs são apontados como "solventes verdes". A justificativa para rotulá-los "verdes" é baseada no fato de que, dentre os 12 princípios da Química Verde, os LIs podem atender à 4 destes princípios, são eles: (EARLE *et al.*, 2006; RANKE *et al.*, 2007; PRETTI *et al.*, 2009; FUKAYA e OHNO, 2013; BUBALO, *et al.*, 2015).

- I. Síntese de produtos menos perigosos: Quando possível, deve-se utilizar e gerar uma substância química com pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente;
- II. Desenvolvimento de produtos seguros: Deve-se desenvolver produtos químicos que exerçam a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos;
- III. Desenho para a degradação: Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal maneira que, ao final de sua função, se degradem em produtos inofensivos e não persistam no meio ambiente;
- IV. Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes: Deve-se utilizar substâncias seguras, com nenhum ou mínimo potencial de acidentes, evitando produtos inflamáveis ou que possibilitem vazamentos, incêndios, explosões e outros.

Devido às propriedades citadas anteriormente, como pressão de vapor desprezível e alta estabilidade térmica, muitas vezes o potencial impacto ambiental dos líquidos iônicos é considerado reduzido. Entretanto, alguns estudos relatam que apesar dos LIs contribuírem para a redução da poluição do ar, o seu descarte inadequado em ambientes aquáticos pode causar a contaminação da água, devido à sua potencial toxicidade e difícil biodegradabilidade (ZHAO, *et al.*, 2007; HECKENBACH *et al.*, 2016). O fato de que as características dos líquidos iônicos podem ser manipuladas a partir da sua síntese combinada tem promovido vários esforços para produção de LIs biodegradáveis (GATHERGOOD *et al.*, 2004). Outra alternativa para minimizar os possíveis efeitos negativos do descarte de LIs no meio ambiente é a sua recuperação e/ou reciclagem, cuja metodologia de extração depende do processo no qual o LI é aplicado (ALVAREZ-GUERRA *et al.*, 2014; CLAUDIO *et al.*, 2014).

Segundo ROGERS *et al.* (2012), esses solventes não convencionais têm atraído um grande interesse por possuir características físico-químicas atrativas para inúmeros processos quando comparado com solventes convencionais, tais como:

- i. Funcionam como excelentes solventes para um amplo número de materiais orgânicos e inorgânicos. Isso possibilita a sua utilização em reações com ambos os tipos de reagentes, tornando-os, portanto, viáveis e extremamente atrativos do ponto de vista tecnológico e industrial;
- ii. A capacidade inflamável é desprezível porque esses solventes não são voláteis. Assim, os líquidos iônicos podem ser usados em elevadas temperaturas, diminuindo os riscos. Além disso, podem ser considerados como solventes combustíveis;
- iii. Possibilidade de recuperação, remoção e reciclagem devido à alta estabilidade térmica e química;
- iv. A boa condutividade elétrica e grande mobilidade iônica favorece o alto potencial eletroquímico. No mais, a janela eletroquímica estável dos LIs minimiza processos de oxidação ou redução sobre um eletrodo;
- v. As propriedades catalíticas em síntese orgânica e inorgânica são amplamente atrativas. Os LIs influenciam de forma positiva na seletividade e nos rendimentos em diferentes reações;
- vi. A solubilidade dos líquidos iônicos pode ser ajustada para que estes solventes sejam miscíveis com água e até com alguns solventes orgânicos. Muitos possuem a capacidade de dissolver uma ampla gama de ácidos inorgânicos e orgânicos. Isto é importante para processos que necessitam da dissolução de distintos reagentes numa mesma fase;
- vii. A hidrofiliabilidade e a hidrofobicidade dos líquidos iônicos podem ser alteradas a partir da modificação na estrutura dos cátions e ânions sintetizados.

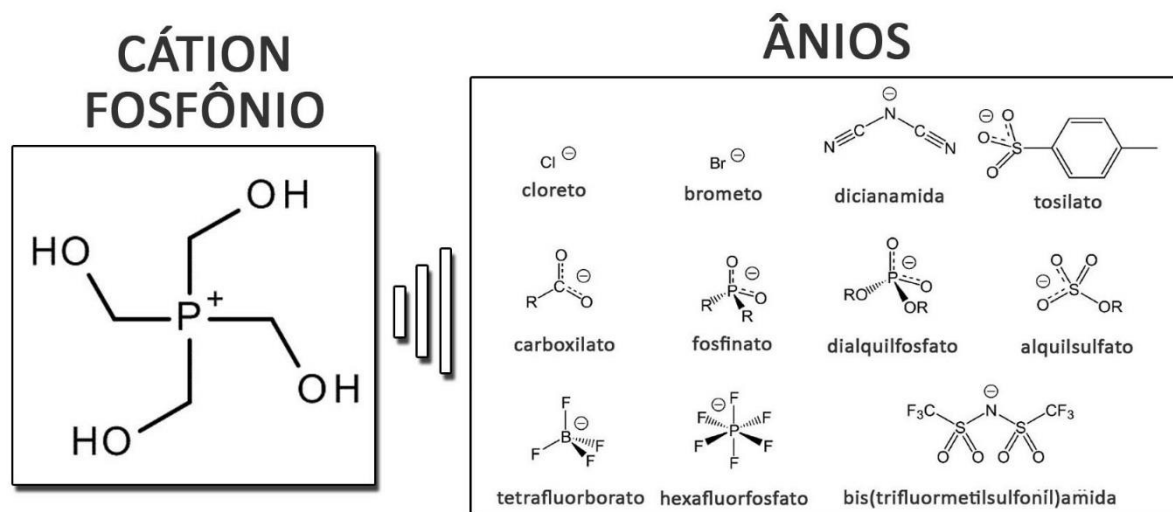
Os líquidos iônicos, como os solventes em geral, são classificados com base na estrutura química. No entanto, os LIs possuem características estruturais que podem ser facilmente manipuladas, isso faz com que a sua classificação seja complexa. De modo geral, os LIs são classificados como próticos e apróticos, com base na divisão estabelecida entre doadores de prótons (prótico) e não doadores de prótons (aprótico) (KATO e GMEHLING, 2004). Os LIs

chamados de próticos são aqueles formados a partir da combinação de um ácido e uma base de Bronsted, que possuem um próton de grande mobilidade e apresentam vantagens como baixo custo, simplicidade de síntese e baixa toxicidade (ÁLVAREZ *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013). Os líquidos iônicos apróticos formam ligação de hidrogênio e são referidos como os LIs constituídos principalmente dos cátions orgânicos a base de imidazólio, piridínio, amônio e fosfônio. Estes ainda apresentam elevados custos de síntese, o que dificulta sua aplicação industrial (ZOU *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2015).

### **3.1.1. Líquidos iônicos à base de fosfônio**

Os líquidos iônicos à base de fosfônio (LIFs) são uma família de solventes não convencionais prontamente disponíveis, produzidos por meio da quaternização de um alquil fosfina com um análogo alcano. No entanto, quando comparados com LIs com cátions à base de nitrogênio, tais como imidazólio e piridínio, os LIFs ainda têm sido muito menos estudados. Este fato pode ser atribuído à dificuldade na síntese de materiais derivados de fosfina, como por exemplo, o tributílfosfina (DEL SESTO *et al.*, 2005; ATEFI *et al.*, 2009; FRASER *et al.*, 2009; COWAN *et al.*, 2016).

Os primeiros relatos a respeito de líquidos iônicos à base de fosfônio foram publicados na década de 1970, entretanto, somente após o ano de 1990 que o tributílfosfina tornou-se disponível comercialmente. A partir de então, uma variedade de ânions vem sendo sintetizado juntamente com o cátion fosfônio e estão disponíveis em escala comercial desde 2008, principalmente pela Cytec Industries Inc., como mostra a Figura 1 (BRADARIC *et al.*, 2003). Naturalmente, nem todos estes sais de fosfônio são líquidos à temperatura ambiente, mas por meio de combinação cuidadosa das propriedades do cátion com as do ânion, diversos sais de fosfônio podem ser sintetizados de forma a atender a definição geral do LIs, como pontos de fusão inferiores a 100°C. Geralmente, os LIFs apresentam densidade entre 0,88 e 1,07 g/cm<sup>-3</sup> e temperatura de decomposição entre 250 e 400°C (HERRIOTT *et al.*, 1975).



**Figura 1:** Cátion fosfônio e exemplos de ânions que podem ser emparelhados para produzir líquidos iônicos à base de fosfônio.

**Fonte:** Adaptado de Bradaric *et al.*, 2003.

Os LIFs foram testados em diferentes estudos, tais como solventes de extração, solventes de síntese química, eletrólitos em baterias, protetores contra corrosão, entre outros (MATSUBARA *et al.*, 2015). Em algumas aplicações, os LIFs ofereceram propriedades superiores aos LIs à base de imidazólios e piridínios, como maior estabilidade térmica e menor viscosidade (JEEVAPANI *et al.*, 2014). Por estas razões, LIFs já estão sendo desenvolvidos e aplicados como solventes, catalisadores de transferência de fase, meios de eletroquímica, agentes de esfoliação para argilas, catalisadores, biocatalisadores e em reações de policarbonato em alta temperatura (MIRAU *et al.*, 2008; FRASER *et al.*, 2009; MATSUBARA *et al.*, 2015).

### 3.2. ENZIMAS E LÍQUIDOS IÔNICOS

Enzimas são biocatalisadores, geralmente, de natureza proteica produzidas por animais, plantas e micro-organismos, formadas por uma extensa cadeia de aminoácidos unidos por meio de ligações peptídicas. Estas operam em condições brandas de pH, temperatura e pressão, dependendo da força iônica do meio para que não ocorra a desnaturação e perda da sua atividade catalítica. Uma das principais características destes biocatalisadores é que as reações na sua presença atingem velocidades muito maiores que as reações na presença de catalisadores químicos (BON *et al.*, 2008; ARMENTA *et al.*, 2015). Além disso, devido à sua elevada especificidade, um maior rendimento do processo pode ser atingido, permitindo a obtenção de

produtos biodegradáveis e reduzindo a quantidade de resíduos gerados (DE CASTRO *et al.*, 2014).

Dentre as enzimas, as lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) têm alcançado um destaque cada vez maior no cenário da biocatálise, estimulado sobretudo pelos avanços em processos biotecnológicos (síntese orgânica e quiral), biodiesel, óleos e gorduras e produtos farmacêuticos (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). As lipases têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, além de catalisar reações de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização. Estas são originadas de plantas, animais ou micro-organismos e devido à essa ampla disponibilidade, seletividade e relevante capacidade de operar em meios orgânicos a sua aplicação tornou-se atraente para um grande número de áreas industriais, como nas indústrias de alimentos, detergentes, artigos de couro, têxteis, cosméticos e produtos farmacêuticos (PAQUES e MACEDO, 2006; BON *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2011; GOG *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2012; NARWAL e GUPTA, 2013).

A partir do expressivo interesse em líquidos iônicos e com o objetivo de otimizar ainda mais as reações biocatalíticas, diversos grupos de pesquisas em todo mundo relatam reações catalíticas que foram testadas e modificadas com sucesso a partir da adição desses “solventes verdes”. O primeiro trabalho referente à biocatálise com a combinação enzimas e LI foi publicado em 2000 e, desde então, o número de publicações destinados ao estudo de reações catalisadas por enzimas na presença de líquidos iônico tem aumentado bruscamente nos últimos anos (GAO *et al.*, 2015).

A Figura 2 exibe, ao longo dos últimos 16 anos, o resumo do crescente número de artigos em que as palavras-chave “*ionic liquid*” e “*enzyme*” são usadas. O número de pedidos de patentes emitidos ou pendentes segue uma tendência similar. Coletivamente, esses estudos têm resumido diferentes aspectos do uso de biocatalisadores combinados com líquidos iônicos, em que questões fundamentais relacionadas com os efeitos de LIs sobre a estrutura, atividade e estabilidade de enzimas têm sido exploradas. Também são avaliados os impactos da utilização de LIs como agentes modificadores de suportes sólidos, bem como aditivos adicionados durante a imobilização do biocatalisador, empregando uma variedade de combinações de enzimas e líquidos iônicos em diferentes sistemas de reação. A fim de obter produtos químicos biodegradáveis mais seguros e reduzir ou eliminar totalmente os resíduos



(YANG, 2009; ZHAO *et al.*, 2010; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013; REHMANN *et al.*, 2014; CABRERA-PADILLA *et al.*, 2015; FINDRIK *et al.*, 2016).

A justificativa para o relevante crescimento em publicações referente ao uso de enzimas juntamente com LIs é o fato de que esta combinação pode aumentar ou inibir a atividade enzimática, ao contrário do que normalmente ocorre com o uso de solventes convencionais, que inibem a atividade catalítica e promovem a desnaturação da enzima (RANTWIJK e SHELDON, 2007; ZHAO, 2016). O incremento na atividade catalítica ocorre devido às características dos LIs, já que suas propriedades podem ser ajustadas de forma a favorecer o desempenho enzimático. As incontáveis combinações entre cátions e ânions podem contribuir para uma maior estabilidade da enzima (FINDRIK *et al.*, 2016).

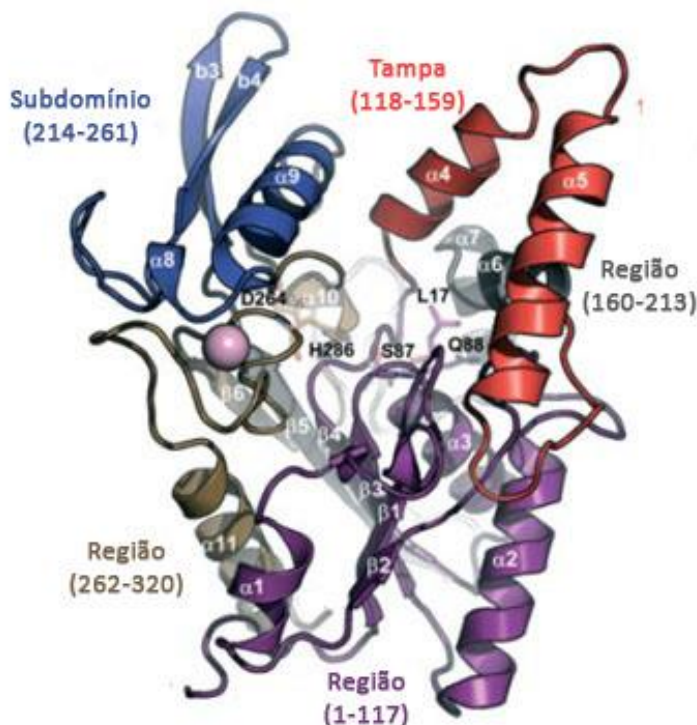


**Figura 2:** Quantidade por ano de artigos publicados e as citações associadas às palavras-chave “ionic liquid” e “enzyme” no site *Web of Science*, entre os anos de 2000 e 2016.

### 3.2.1. Lipase *Burkholderia cepacia*

A lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) é uma proteína que possui 33 kDa de massa molar, com dimensões aproximadas de 3nm × 4nm × 5nm (60nm<sup>3</sup>) e 320 resíduos de aminoácidos de Serina, Histidina, Aspartato, entre outros (KIM *et al.*, 1997). A LBC possui boa atividade em uma ampla faixa de pH (3,5-11), no entanto, apresenta pH ótimo entre 7 e 8 e, geralmente, é empregada na produção industrial para síntese de compostos quirais e ésteres (BARON *et al.*, 2004; BARBE *et al.*, 2009). A Figura 3 ilustra a estrutura tridimensional da LBC, onde as fitas estão representadas por setas ( $\beta$ ) e hélices ( $\alpha$ ). A tampa que engloba a região entre 118 e 159 é representada em vermelho, o subdomínio voltado para a tampa (214-261) está na cor azul, a

região 1-117 é colorido em roxo, a região 160-213 em cinza e a região 262-320 em marrom. A posição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  está indicada por uma esfera na cor lilás. A tríade catalítica (S87, D264 e H286) e os resíduos de aminoácidos (L17 e Q88) são mostrados na forma de bastão.



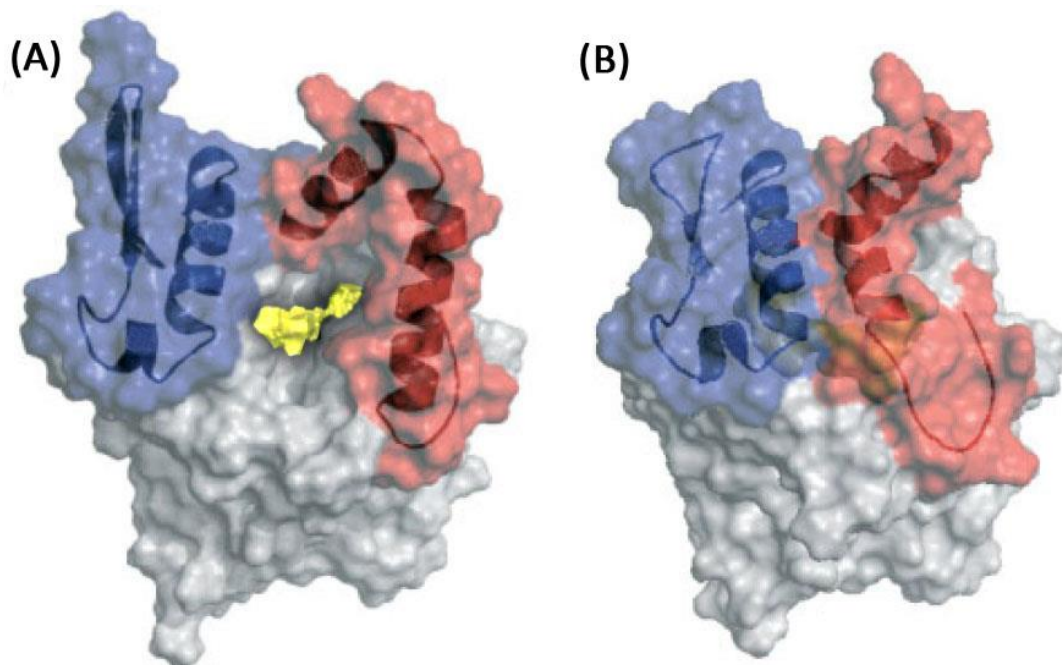
**Figura 3:** Representação da estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia*.

**Fonte:** Adaptado de Barbe, 2009.

Uma característica importante deste tipo de lipase é a presença de uma região móvel, denominado de “tampa”, que altera a sua conformação de diferentes formas, dependendo do ambiente em que se encontra. Tornando a tríade catalítica ou sítio catalítico acessível (“tampa aberta”) para os substratos ou protegido (“tampa fechada”) do ambiente externo. Assim, a “tampa”, que possui características variadas de acordo com cada tipo de enzima, sofre rearranjos conformacionais drásticos que torna a enzima inativa (“tampa fechada”) ou ativa (“tampa aberta”) (VERGER, 1997; BON *et al.*, 2008).

De modo geral, a conformação aberta (Figura 4A) prevalece quando existe afinidade entre o sítio catalítico da enzima e o substrato, que ocorre geralmente em meios orgânicos e nas interfaces água/lipídios, onde as lipases são altamente ativas. A conformação fechada (Figura 4B) é predominante em meios aquosos, indicado pela baixa atividade lipolítica para maior parte das lipases em água (REIS *et al.*, 2009). Não só a conformação da “tampa” (grau de abertura), mas também a sua natureza anfifílica desempenha um papel fundamental na atividade das lipases, que caracteriza regiões hidrofílicas solúveis em meio aquoso e regiões hidrofóbicas

insolúveis em água e solúveis em lipídios e meios orgânicos. Além disso, a sequência específica de aminoácidos demonstra um papel-chave na especificidade dessa classe de enzimas (SECUNDO *et al.*, 2006; BELLE *et al.*, 2007; RANALDI *et al.*, 2009).



**Figura 4:** Representação das mudanças conformacionais que ocorrem na lipase *Burkholderia cepacia*. A região da tampa é representada em vermelho e a região em azul indica o subdomínio. A tríade catalítica e os resíduos de aminoácidos são ilustrados em amarelo. (A) Estrutura da LBC com a tampa na conformação aberta (B) Estrutura com tampa na conformação fechada.

**Fonte:** Adaptado de Barbe *et al.*, 2009.

Trodler *et al.* (2009), realizaram uma análise detalhada por meio de várias simulações de dinâmica molecular da conformação aberta e fechada da lipase *Burkholderia cepacia* em água e tolueno, a fim de investigar a influência desses solventes na estrutura, dinâmica e transição conformacional da tampa. Os resultados mostraram que as transições conformacionais da tampa são ligeiramente dependentes do solvente. Nas simulações em água, a tampa da LBC permaneceu fechada sem qualquer alteração significativa na sua conformação. Enquanto que nas simulações realizadas em tolueno, notou-se uma abertura gradual da tampa da LBC, expondo seu sítio catalítico. No estudo realizado por Barbe *et al.* (2009), os autores avaliaram a movimentação da tampa da LBC em água e na interface hexano-água, por meio de simulações de transições conformacionais. Os resultados indicaram que a tampa se manteve na conformação fechada na presença da água, e apresentou a abertura da tampa na interface hexano-água.

### 3.2.2. Líquidos iônicos como ativadores/inativadores de enzimas

Sistemas utilizando líquidos iônicos e enzimas numa mesma reação já foram descritos há algum tempo, mas somente nos últimos anos o potencial dessa combinação foi reconhecido (SHELDON, 2001; CANTONE *et al.*, 2007). LIs são relatados como solventes não convencionais apropriados para aumentar a atividade e conseqüentemente a estabilidade de enzimas, em contraste com solventes orgânicos comuns (Tabela 1). A partir de então, novas aplicações de enzimas na presença de LIs foram surgindo (SHU *et al.*, 2011; NORDWALD e KAAR, 2013). No entanto, dependendo da natureza da enzima e das características do LI, esse aditivo pode ou não ser apropriado para a reação. Assim, é indispensável avaliar de forma mais específica os parâmetros que influenciam o comportamento das enzimas em presença de LIs (PAPADOPOULOU *et al.*, 2013; MATSUBARA *et al.*, 2015).

Segundo Zhao (2005), LIs com cátions com cadeias catiônicas maiores promovem maiores benefícios para a atividade enzimática quando comparado com LIs com cadeias catiônicas menores, a depender da natureza do ânion associado. A razão para isto é que LIs com maiores cadeias catiônicas apresentam características hidrofóbicas e assim, oferecem menor tendência para desestabilizar as moléculas de água essenciais para a manutenção da enzima. Dessa forma, verificou-se que os LIs hidrofóbicos mantiveram e até aumentaram a atividade e estabilidade da lipase avaliada. Enquanto que LIs com características hidrofílicas, removeram as moléculas de água presentes na camada de hidratação e reduziram a atividade da enzima.

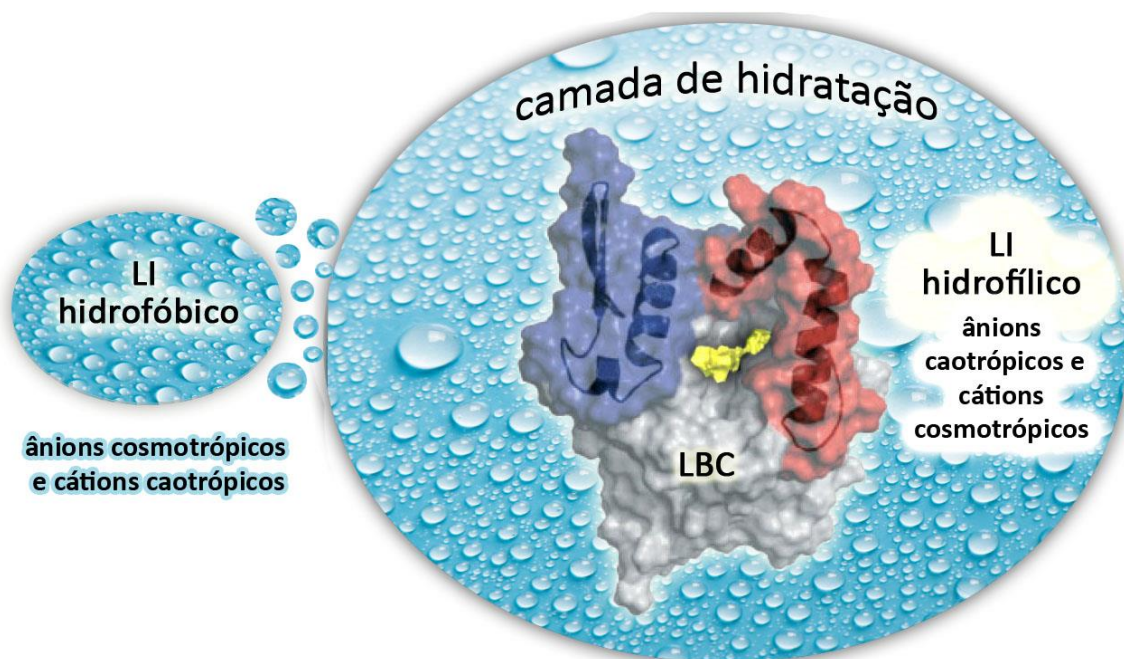
A inativação e subsequente desestabilização de enzimas em LIs, embora não seja bem compreendida, pode ser atribuída à interação direta entre enzimas e o LI. Estudos sugerem que a estabilidade e ativação da enzima são altamente dependentes de alguns fatores, tais como: conformação estrutural da enzima; interação por forças eletrostáticas; ligações de hidrogênio e hidrofóbicas; e remoção de moléculas de água essencial para atividade da enzima, que são ligeiramente influenciadas pela hidrofobicidade/hidrofilicidade do cátion e ânion do LI (KUMAR e VENKATESU, 2014; GAO *et al.*, 2015).

**Tabela 1:** Aplicação de líquidos iônicos como ativadores/inativadores de lipases.

| <b>Líquido Iônico</b>   | <b>Fonte de lipase</b>      | <b>Referência</b>                 |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio   |                             |                                   |
| Cloreto de 1-metil-3-octilimidazólio  |                             |                                   |
| Trifluormetanosulfonato de 1-butil-3-metilimidazólio  | <i>Candida antarctica</i>   | Ventura <i>et al.</i> , 2012      |
| Acetato de 1-butil-3-metilimidazólio  |                             |                                   |
| Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio  |                             |                                   |
| Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio  | <i>Candida rugosa</i>       | Nordwald e Kaar, 2013             |
| Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazólio   | <i>Carica papaya</i>        |                                   |
| 2-hidroxi-N-metiletanoamônio  |                             |                                   |
| bis(2-hidroxi-etil)amônio   | <i>Agaricus bisporus</i>    | Papadopoulou <i>et al.</i> , 2013 |
| 2-hidroxi-etilamônio  |                             |                                   |
| tributil([2-metil]metoximetil)fosfônio<br>C <sub>16</sub> (PEG) <sub>10</sub> SO <sub>4</sub>     |                             |                                   |
| tributil(2-metiletil)fosfônio<br>C <sub>16</sub> (PEG) <sub>10</sub> SO <sub>4</sub>              | <i>Burkholderia cepacia</i> | Matsubara <i>et al.</i> , 2015    |
| tributil( <i>n</i> -octil)fosfônio<br>C <sub>16</sub> (PEG) <sub>10</sub> SO <sub>4</sub>         |                             |                                   |
| tributil( <i>n</i> -hexadecanil)fosfônio<br>C <sub>16</sub> (PEG) <sub>10</sub> SO <sub>4</sub> ) |                             |                                   |
| 1-hexil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato   | <i>Candida rugosa</i>       | Su <i>et al.</i> , 2016           |

A água aumenta a mobilidade e a flexibilidade dos sítios catalíticos e, simultaneamente, a manutenção da estrutura proteica. No entanto, a quantidade de água necessária para a catálise depende das características de cada enzima e do meio (LIMA e ANGNES, 1999; BALL, 2008). De forma geral, solventes muito polares ou hidrofílicos podem prejudicar a estabilidade enzimática ao interagir com a água e desestabilizar a camada de hidratação da enzima. Solventes hidrofóbicos possuem uma menor capacidade de afetar a camada de hidratação da enzima. Assim, conservam a camada de hidratação ao redor da enzima, o que favorece a atividade enzimática (COLLINS *et al.*, 2007).

Os íons do LI dão origem a cátions e ânions que, de acordo com a natureza e concentração, podem afetar o desempenho da enzima (SCHIFFER *et al.*, 1996). A Figura 5 ilustra os efeitos relevantes que os íons têm na atividade enzimática, que é normalmente estabilizada por ânions cosmotrópicos e cátions caotrópicos, predominantes em líquidos iônicos hidrofóbicos. A proteína é desestabilizada por ânions caotrópicos e cátions cosmotrópicos, presentes geralmente em LIs hidrofílicos (YANG *et al.*, 2013; ZHAO, 2016).



**Figura 5:** Ilustração das interações entre líquidos iônicos hidrofóbicos (ânions cosmotrópicos e cátions caotrópicos) e hidrofílicos (ânions caotrópicos e cátions cosmotrópicos) e a lipase *Burkholderia cepacia*.

**Fonte:** Adaptado de Zhao, 2016.

Ânions cosmotrópicos competem com moléculas da água associadas à camada de hidratação da enzima, devido à sua forte interação com a água. Isto faz com que a enzima

minimize a área exposta ao solvente, estimulando o estado compacto da enzima devido ao efeito hidrofóbico (CHEN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012). No caso dos ânions caotrópicos, ocorre o processo contrário, já que os mesmos têm baixa afinidade com água e alta polarizabilidade, assim, esses ânions ligam-se à interface água-enzima, desestabilizando a estrutura da proteína (COLLINS *et al.*, 2007; REMBERT *et al.*, 2012). Cátions apresentam efeito menor quando comparados com ânions com mesma densidade de carga, pois agem indiretamente através da interação com o ânion (GIBB *et al.*, 2011; KUMAR e VENKATESU, 2014). Neste contexto, o estudo da influência das interações entre líquidos iônicos hidrofóbicos e hidrofílicos faz-se a partir do estudo preliminar da estrutura da enzima e do seu comportamento na presença de outros solventes (ZHAO *et al.*, 2015).

Ventura *et al.* (2012), avaliaram o efeito da concentração, do tamanho de cadeias catiônicas e dos ânions de líquidos iônicos à base de imidazólios de natureza hidrofílica sobre a atividade enzimática da lipase B de *Candida antarctica*. Os resultados indicaram que o caráter hidrofílico dos LIs provocou efeito negativo sobre a camada de hidratação da enzima e, conseqüentemente sobre a atividade da lipase, com maior perda de atividade para a maior concentração de LI. Em relação à variação da cadeia catiônica, notou-se que o aumento da cadeia dos LIs hidrofílicos reduziu drasticamente a atividade, a qual causou uma maior capacidade do líquido iônico para obstruir o sítio catalítico não polar da enzima.

Em um estudo mais recente, Matsubara *et al.* (2015), sintetizaram quatro líquidos iônicos à base de fosfônio com diferentes cadeias catiônicas (tributil([2-metil]metoximetil)fosfônio  $C_{16}(PEG)_{10}SO_4$ , tributil(2-metiletil)fosfônio  $C_{16}(PEG)_{10}SO_4$ , tributil(*n*-octil)fosfônio  $C_{16}(PEG)_{10}SO_4$ , tributil(*n*-hexadecanil)fosfônio  $C_{16}(PEG)_{10}SO_4$ ), que foram utilizados como agentes de ativação por revestimento da lipase *Burkholderia cepacia* por meio do processo de liofilização. Os resultados indicaram que a parte catiônica dos LIs desempenha um papel crucial na modificação da atividade enzimática, uma vez que foram verificados diferentes valores de velocidades reacionais com a variação do comprimento do cátion. Ademais, os autores também evidenciaram que após o revestimento com os líquidos iônicos à base de fosfônio, foi possível armazenar a LBC em dessecador à temperatura ambiente por mais de um ano, sem qualquer perda da sua atividade enzimática.

### 3.3. BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS

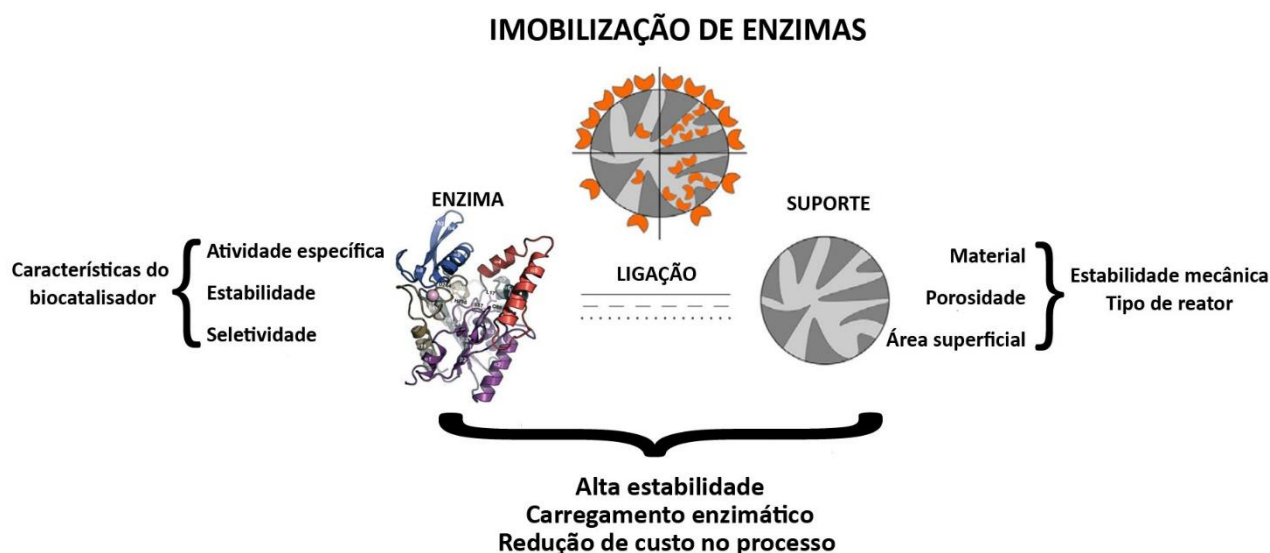
O enorme potencial catalítico oferecido pelas enzimas para os mais variados tipos de reações é indiscutível (GRAY *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013). No entanto, uso de enzimas solúveis apresenta desvantagens no que diz respeito à estabilidade operacional e de armazenamento, devido à complexidade e sensibilidade da sua estrutura tridimensional, fundamentais para a atividade enzimática (SHELDON *et al.*, 2011; HANEFELD *et al.*, 2013). As condições ótimas são específicas de cada tipo de enzima, mas geralmente na sua forma livre estas são inativadas quando estão expostas a condições drásticas, tais como temperaturas elevadas e variação de pH (CANTONE *et al.*, 2013). A baixa estabilidade térmica, o intervalo estreito de pH, a impossibilidade de recuperação e reuso devido à perda da atividade enzimática depois de um ciclo, são os maiores obstáculos para a utilização de enzimas em muitos processos, pois as enzimas apresentam alto custo (DICOSIMO *et al.*, 2013; JESIONOWSKI *et al.*, 2014).

Entre os vários métodos usados para amenizar estas desvantagens, a maior estabilização foi obtida por meio da imobilização de enzimas em um suporte sólido e, certamente, este é o método mais aplicado (ZHAO, 2010). Assim, em contraste com a aplicação de enzimas solúveis na indústria, biocatalisadores imobilizados (BI) oferecem vantagens no que diz respeito à maior estabilidade, possibilidade de reutilização, capacidade de reciclagem, bem como aplicações em reatores contínuos (LIESE e HILTERHAUS, 2013). O termo imobilização de enzimas foi definido no início da década de 1970, pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática que definiu a técnica como: “enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (BON *et al.*, 2008).

A Figura 6 mostra os principais parâmetros para obtenção de uma imobilização eficiente, que levam em conta características estruturais da enzima (atividade específica, estabilidade e seletividade), composição química e superficial do material empregado como suporte (tipo de material, porosidade e área superficial), além do tipo de ligação entre a enzima e o suporte (HANEFELD *et al.*, 2009; SHELDON e PELT, 2013). A fim de obter bons resultados quanto ao carregamento de enzima em relação a unidade de massa de suporte e estabilidade do biocatalisador imobilizado e redução de custos no processo (BAYNE *et al.*, 2013; BOLIVAR *et al.*, 2016).



De modo geral, a imobilização de enzimas promove efeitos benéficos no que diz respeito a estabilidade, devido às interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima, possibilitando a sua reutilização, o que contribui para o aumento da vida útil e redução do custo do biocatalisador (MEUNIER *et al.*, 2012). Além disso, o uso de enzimas imobilizadas permite reações com catálises heterogêneas, facilita a separação de produtos e, em muitos processos, reduz a geração de efluentes, minimizando os impactos ambientais (MILETIC *et al.*, 2012).



**Figura 6:** Principais parâmetros relacionados a enzima, suporte e tipo de ligação para obtenção de uma imobilização eficiente.

**Fonte:** Adaptado de Bolivar *et al.*, 2016.

Os métodos de imobilização são classificados a partir do tipo interação que ocorre entre a enzima e o suporte, que pode ser física ou química, ou das características da matriz. Geralmente, esses métodos são classificados de três diferentes formas: ligação ao suporte, ligação cruzada e encapsulação. Além disso, a ligação entre a enzima e o suporte pode classificar os métodos de imobilização como reversíveis e irreversíveis. Na imobilização irreversível, uma vez em que as enzimas estão ligadas ao suporte, elas não podem ser desconectadas sem destruir a atividade da enzima e do suporte (EŞ *et al.*, 2015).

Adsorção física, ligação covalente e encapsulação são os métodos mais utilizados para imobilização de enzimas. As técnicas de imobilização por adsorção física da enzima em um suporte por meio de forças físicas e ligações não covalentes (ligação de afinidade e quelação), são métodos de imobilização reversíveis. Porém, a técnica de ligações covalentes, que ocorre entre os resíduos terminais da enzima e os grupos funcionais do suporte ou entre duas ou mais

moléculas de enzima, além da imobilização por encapsulação e ligações cruzadas são métodos irreversíveis (GUNCHEVA *et al.*, 2011; SHELDON *et al.*, 2013). Cada uma dessas técnicas tem suas vantagens e desvantagens, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas.

| <b>Método de Imobilização</b> | <b>Adsorção Física</b>  | <b>Ligação Covalente</b>  | <b>Encapsulação</b>  |
|-------------------------------|---|---|--|
| <b>Vantagens</b>              | Baixo custo, simples, não ocorre modificação química da enzima e pode ser possível a reutilização do suporte. | Não é afetado pelo pH, força iônica do meio ou concentração do substrato. | Não ocorre modificação química da enzima.  |
| <b>Desvantagens</b>           | A imobilização pode ocorrer apenas na superfície e dessorção da enzima com o tempo/uso.                       | Não é possível regenerar o suporte e apresenta um alto custo.             | Apresenta limitação de difusão, susceptível à inativação da enzima e ocorre perda contínua de atividade devido ao tamanho dos poros. |

**Fonte:** DE CASTRO *et al.*, 2008.

### **3.3.1. Adsorção física**

Adsorção física (ADS) é o método de imobilização que consiste em uma ligação simples entre a enzima e o suporte, por meio de forças físicas com interações fracas, tais como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e interações iônicas (MATEO *et al.*, 2007; MANOEL *et al.*, 2015). Como a ligação é fraca, a imobilização não altera a estrutura nativa da enzima, o que mantém o seu sítio ativo intacto e conserva a sua atividade (HERNANDEZ e FERNANDEZ-LAFUENTE 2011; HWANG e GU 2013). Entre os vários métodos existentes, a adsorção física é o mais estudado e empregado no setor industrial para imobilização de lipases em diversos tipos de suportes, como mostra a Tabela 3.

Quando comparado com outros métodos de imobilização, a ADS apresenta vantagens pelos seguintes aspectos: condições brandas e operações fáceis; baixo custo relativo de materiais de suporte e processo de imobilização; não requer adição de aditivos químicos durante a adsorção; regeneração fácil dos suportes para reciclagem e alta recuperação de atividade das enzimas; e reutilização do suporte por dessorção de moléculas inativas de enzima localizadas

na superfície do biocatalisador (ZHANG *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014). De modo geral, qualquer suporte pode ser aplicado na imobilização da enzima por ADS. Entretanto, nem todas as enzimas podem ser imobilizadas em todos os tipos de suporte. A razão é que para que ocorra uma adsorção bem-sucedida, algumas condições têm de ser atendidas, entre os quais a afinidade entre a enzima e o suporte é a mais importante. Isto é assegurado pela presença dos grupos ativos específicos sobre o suporte, que permitem a ligação enzima-suporte (ZHAO *et al.*, 2015).

**Tabela 3:** Aplicação de adsorção física para imobilização de lipases em diferentes suportes.

| <b>Classificação do suporte</b> | <b>Suporte</b>       | <b>Fonte de lipase</b>         | <b>Referência</b>                    |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Orgânicos                       | Poliacrilonitrila    | <i>Pseudomonas cepacia</i>     | Sakai <i>et al.</i> , 2010           |
|                                 | Poliacrilato         | <i>B Candida antarctica</i>    | Jun <i>et al.</i> , 2013             |
|                                 | PHBV                 | <i>Candida rugosa</i>          | Cabrera-Padilla <i>et al.</i> , 2015 |
|                                 | Poli-hidroxibutirato | <i>Geotrichum candidum</i>     | Ramos <i>et al.</i> , 2015           |
|                                 | PHBV                 | <i>Bacillus</i> sp.            | Cabrera-Padilla <i>et al.</i> , 2015 |
|                                 | Poli-metacrilato     | <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Lage <i>et al.</i> , 2016            |
| Inorgânicos                     | Sílica               | <i>Rhizopus oryzae</i>         | Kharrata <i>et al.</i> , 2011        |
|                                 | MCM-41               | <i>Candida rugosa</i>          | Katiyar e Ali, 2012                  |
|                                 | Silicato Hidrofóbico | <i>Candida</i> sp.             | Zhao <i>et al.</i> , 2014            |
|                                 | Sílica               | <i>Candida rugosa</i>          | Yu <i>et al.</i> , 2015              |

### 3.3.2. Líquidos iônicos como aditivos durante a imobilização de enzimas

A utilização de aditivos durante o processo de imobilização de enzimas é uma das abordagens descritas na literatura com o objetivo de otimizar o preparo de biocatalisadores

imobilizados. A principal razão para isto é que a presença desses aditivos pode influenciar positivamente a atividade e estabilidade de biocatalisadores imobilizados (ZARCULA *et al.*, 2010). Dentre os aditivos utilizados, os líquidos iônicos têm ganhado destaque por favorecer o aumento da atividade enzimática, bem como causar modificações estruturais em suportes, promovendo um aumento no rendimento de imobilização e estabilidade operacional para os biocatalisadores imobilizados (LEE *et al.*, 2007; VILA-REAL *et al.*, 2011). A Tabela 4 exhibe estudos voltados para a aplicação de diversos LIs durante o processo de imobilização.

Cabrera-Padilla *et al.* (2015), utilizaram 1% (m/v) de líquidos iônicos à base de imidazólios como aditivos durante a imobilização por adsorção física da lipase *Candida rugosa* em suporte de Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV). Foi investigada a influência do núcleo e do tamanho da cadeia catiônica, além das características dos ânions no processo de imobilização. As caracterizações físico-química e morfológica revelaram bons resultados para a imobilização da enzima na presença dos LIs, com melhor rendimento de imobilização (78%) para o LI com núcleo catiônico mais hidrofóbico, com maior cadeia e ânion mais hidrofóbico.

No estudo realizado por Souza *et al.* (2013), líquidos iônicos apróticos baseados em monoetanolamina com diferentes comprimentos de cadeia catiônica e em diferentes concentrações foram utilizados para encapsulação da lipase *Burkholderia cepacia* pela técnica sol-gel. Os resultados mostraram um aumento na eficiência catalítica de 35 vezes para o sistema imobilizado na presença de LI quando comparado com o sistema sem o aditivo. Esse efeito positivo foi atribuído às modificações que o LI provocou nos poros e na superfície do suporte, além da proteção na camada de hidratação ao redor da enzima, evitando a desnaturação da enzima pela presença de álcool durante a encapsulação. No que diz respeito à influência do tamanho da cadeia catiônica, foi observado que o LI com maior cadeia promoveu os melhores resultados de rendimento de imobilização e melhor efeito positivo na estrutura morfológica da sílica, devido ao seu caráter mais hidrofóbico.

Na literatura, além de estudos envolvendo o uso de líquidos iônicos como aditivos durante a imobilização de enzimas, existem alguns relatos da aplicação de LIs como agentes modificadores de suportes, como por exemplo a sílica.

**Tabela 4:** Aplicação de líquidos iônicos como aditivos na imobilização de enzimas.

|                               |  |  |                              |                                      |   |
|-------------------------------|--|--|------------------------------|--------------------------------------|---|
| <b>Líquidos Iônicos</b>       | Tetrafluorborato de 1-etil-3-metilimidazólio   |  |                              |                                      | Cloreto de 3-metilpiridínio-1-butil                           |
|                               | Tetrafluorborato de 1-propil-3-metilimidazólio | Tetrafluorborato de 1-etil-3-metilimidazólio                 |                              | Acetato de N-metilmonoetanolamina    | Cloreto de 3-metilimidazólio-1-butil                          |
|                               | Tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio  | Bis(trifluorometilsulfonil)amida de 1-etil-3-metilimidazólio |                              | Propinato de N-metilmonoetanolamina  | Dicianamida de 1-butil-3-metilimidazólio                      |
|                               | Tetrafluorborato de 1-hexil-3-metilimidazólio  | Trifluoroacetato de metil-trioctilamônio                     |                              | Butirato de N-metilmonoetanolamina   | Bis(trifluorometilsulfonil)amida de 1-butil-3-metilimidazólio |
|                               | Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio | Tetrafluorborato de 1-butil-4-metilpiridínio                 |                              | Pentanoato de N-metilmonoetanolamina | Bis(trifluorometilsulfonil) de 1-etil-3-metilimidazólio       |
|                               | Tetrafluorborato de 1-octil-3-metilimidazólio  |  |                              |                                      |   |
| <b>Enzima</b>                 | Lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i>          | Lipase <i>Burkholderia cepacia</i>                           | Lipase <i>Candida rugosa</i> | Lipase <i>Candida rugosa</i>         |   |
| <b>Suporte</b>                | Sílica   | Tecido de carbono  | Sílica                       | PHBV                                 |   |
| <b>Método de imobilização</b> | Encapsulação                                   | Encapsulação   | Encapsulação                 | Adsorção física                      |   |
| <b>Referência</b>             | Zarcula <i>et al.</i> , 2010                   | Hara <i>et al.</i> , 2010                                    | Souza <i>et al.</i> , 2013   | Cabrera-Padilla <i>et al.</i> , 2015 |   |

### 3.4. SÍLICA E AGENTES MODIFICADORES

Tanto as propriedades dos suportes quanto as condições de imobilização têm significativa influência na eficiência da imobilização. As características químicas e físicas do suporte, tais como, polaridade, razão molar dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, tamanho da partícula, área da superfície, porosidade e tamanho dos poros podem determinar a quantidade de enzima imobilizada e sua atividade catalítica após a imobilização (LIESE e HILTERHAUS, 2013; JESIONOWSKI *et al.*, 2014). A utilização do suporte com estrutura e características adequadas influencia diretamente nas propriedades da enzima imobilizada. Dentre as características que devem ser avaliadas para identificação de um bom suporte, destacam-se: superfície do suporte; estabilidade bioquímica, química e mecânica; resistência a compactação; resistência de ataque microbiológico; morfologia e composição (BON *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

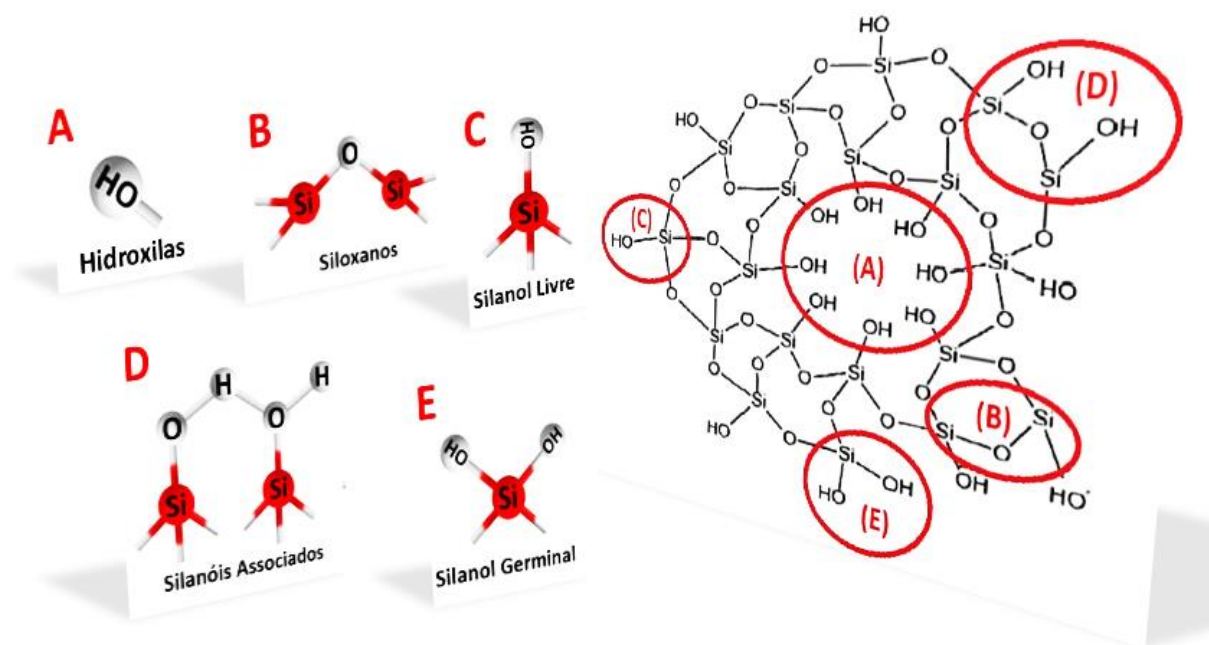
A utilização de suportes orgânicos tem crescido devido à necessidade de novas alternativas baratas, de fácil disponibilidade para os processos de imobilização e a utilização em larga escala. Estes são classificados como naturais (polissacarídeos, celulose, proteínas, biochar, entre outros) e sintéticos (poliestireno, poliacrilatos, polivinílicos, híbridos e etc.) (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011). No entanto, os suportes inorgânicos são os mais utilizados, por apresentarem características satisfatórias para a imobilização de enzimas, tais como, resistência ao ataque microbiano e grande área superficial disponível para a ligação da enzima. Existem também os suportes classificados como minerais (areia, bentonita, pedra-pome, horneblenda, entre outros) e sintéticos (óxido de ferro, vidro, cerâmica, sílica e outras) (ISPAS *et al.*, 2009).

Dentre os suportes que podem ser utilizados para a imobilização de enzimas, a sílica ( $\text{SiO}_2$ ) se destaca por oferecer a possibilidade de modificação da sua superfície, além de ser multifuncional e apresentar boa estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica, atendendo os princípios da União Internacional de Química Pura e Aplicada. (VILAR *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2015). A sílica apresenta estrutura baseada em um tetraedro, onde cada átomo de silício se encontra ligado a quatro átomos de oxigênio e cada oxigênio se encontra ligado a dois átomos de silício (ADAM *et al.*, 2012). Este material pode ser adquirido comercialmente ou ser produzido por diferentes técnicas, onde a mais utilizada para a imobilização de enzimas é a sílica produzida pela técnica sol-gel (ZOU *et al.*, 2014).

A sua produção envolve várias variáveis, como concentração de reagentes, tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador e outras. São essas variáveis que definem as

características finais do sistema, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do material. (SOARES *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2014). Na técnica sol-gel, a primeira etapa é a pré-hidrólise, com adição de uma pequena quantidade de água que provoca a substituição dos grupos alcóxidos (OR) por grupos hidroxilas (-OH). Após a etapa de pré-hidrólise tem-se a adição de uma solução básica, nesse momento acontece a hidrólise completa e na sequência a policondensação e a gelação dos solventes. Dessa forma, géis são formados por reticulados compostos por grupos silanol (Si-OH) e ligações siloxano (Si-O-Si) mais produtos liberados (SOUZA *et al.*, 2013).

Como pode ser observado na Figura 7, as hidroxilas se encontram ligados quimicamente na superfície da sílica-gel, disponíveis como grupos funcionais de ativação do suporte ou como grupamentos de ligação com a enzima (SANTOS *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2010). Os grupos -OH atuam como centros de reação e podem ser apresentados de diferentes formas, tais como: (A) livre (-OH), formando os poros na partícula de sílica; (B) grupos siloxanos ( $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ ); (C) grupos silanóis livres ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ); (D) grupos silanóis associados ( $=\text{Si}(\text{OH})_2$ ); e (E) por meio de ligação de hidrogênio grupos silanóis vicinais ou germinais (BENVENUTTI *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2015).



**Figura 7:** Estrutura da sílica e grupamentos presentes.

**Fonte:** Adaptado de Carvalho *et al.*, 2015.

A sílica é considerada um material de fácil obtenção, com vasta aplicação na imobilização de enzimas. No entanto, a fim de aprimorar propriedades como área superficial e tamanho de

poros, e concomitantemente ampliar a sua aplicação industrial, cresce cada vez mais o número de estudos voltados para o seu aperfeiçoamento (BERNAL *et al.*, 2014). O uso de agentes modificadores de sílica é a forma mais comum para tornar mais eficiente a fixação da enzima neste suporte, entre os mais utilizados estão o polietilenoglicol (PEG), gelatina, albumina, caseína, álcool polivinílico (PVA), líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos (LIs) (REETZ *et al.*, 1996; SOARES *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013).

### ***3.4.1. Líquidos iônicos como agentes modificadores de sílica***

Dentre os agentes modificadores de suportes, os líquidos iônicos têm ganhado grande destaque, como é relatado em alguns trabalhos presentes na Tabela 5. A razão para isto é o fato que estudos revelam, a partir de caracterizações físico-química e morfológica dos suportes e biocatalisadores imobilizados, que a modificação superficial com LIs não causa impedimento na ligação da enzima e suporte, pelo contrário, a adição desse solvente durante a produção do suporte pode favorecer a imobilização do biocatalisador. Isso porque os LIs podem ajustar as características do suporte, tais como área superficial, tamanho e volume dos poros do material e, conseqüentemente, fornecer maior superfície disponível para ligação da enzima no suporte, assim como microambientes adequados para o biocatalisador imobilizado (YANG *et al.*, 2013; ZOU *et al.*, 2014). Nesse contexto, o uso de líquidos iônicos como agentes modificadores de suportes pode produzir biocatalisadores imobilizados com maior eficiência catalítica, em consequência da diminuição dos efeitos difusionais de substratos e produtos durante a reação, além da melhoria da estabilidade operacional em processos contínuos (ISPAS *et al.*, 2009; SHELDON e PELT, 2013).

Segundo Karout e Pierre (2007), a modificação superficial causada pela presença de LIs como agentes modificadores pode influenciar positivamente na estrutura da sílica, promovendo o aumento do tamanho e volume dos poros. No estudo de Hu *et al.* 2012, a lipase *Burkholderia cepacia* foi imobilizada em sílica modificada com diferentes LIs à base de imidazólios e os resultados revelaram que a modificação na superfície do suporte foi uma alternativa eficiente para melhoria da estrutura da sílica, devido ao microambiente formado pela amina e o LI, mantendo assim a conformação favorável da enzima. O que favoreceu as interações entre a enzima e o suporte, promovendo efeitos benéficos em relação à estabilidade térmica e operacional, capacidade de reutilização, além de estabilidade de armazenamento e estabilidade em



solventes orgânicos. De acordo com Zou *et al.* (2014), as propriedades dos LIs são fundamentais para os resultados obtidos na modificação do suporte. Foi observado que a cadeia catiônica mais longa promoveu melhores condições para estabilidade da atividade enzimática da lipase pancreática de porco imobilizada, devido à natureza mais hidrofóbica. Obtendo rendimento de imobilização de até 97%, com a atividade catalítica superior a 62% após cinco ciclos.

**Tabela 5:** Aplicação de líquidos iônicos como agentes modificadores de sílica utilizada para imobilização de lipases.

| <b>Líquido Iônico</b>  | <b>Suporte</b> | <b>Referência</b>         |
|--|----------------|---------------------------|
| Tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio                      | Sílica         | Karout e Pierre, 2007     |
| Tetrafluorborato de 1-butil-4-metilpiridínio                       |                |                           |
| Tetrafluorborato de 1-Metil-3-(3-trimetoxisilil-propil)-imidazólio | SBA-15         | Zou <i>et al.</i> , 2010  |
| 3-Cloropropiltrimetoxisilano-imidazólio                            |                |                           |
| 1-methylimidazólio   | Sílica         | Hu <i>et al.</i> , 2012   |
| 2-Bromoetilamina hidrobrometo-imidazólio                           |                |                           |
| 3-cloropropiltrimetoxisilano-imidazólio                            | Sílica         | Yang <i>et al.</i> , 2013 |
| 3-aminapropiltrimetilsilano-imidazólio                             |                |                           |
| 3-mercaptopropiltrimetilsilano-imidazólio                          | Sílica         | Zou <i>et al.</i> , 2014  |

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Neste tópico são abordados os materiais e métodos utilizados durante o estudo dos efeitos de líquidos iônicos à base de fosfônio no comportamento da lipase *Burkholderia cepacia* livre, na modificação superficial de sílica utilizada para a imobilização da LBC por adsorção física e durante o processo de imobilização da enzima por adsorção física.

#### 4.1. MATERIAIS

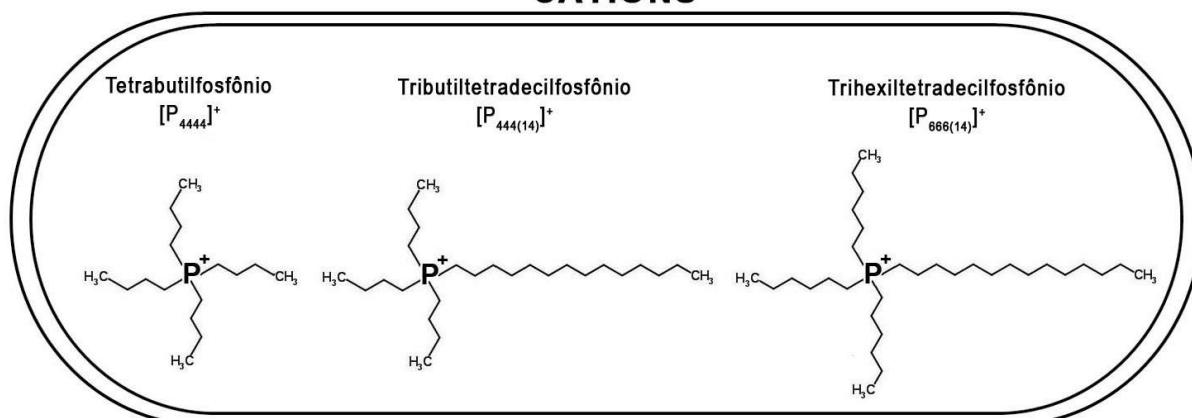
##### 4.1.1. Enzima

Neste trabalho foi utilizada na forma bruta a lipase de origem microbiana *Burkholderia cepacia* (2900,00 U/g a pH 7 e 50°C), adquirida comercialmente da Sigma Aldrich.

##### 4.1.2. Líquidos iônicos

Os setes líquidos iônicos à base de fosfônio estudados neste trabalho foram: cloreto de tetrabutílfosfônio ( $[P_{4444}]Cl$ ) (95% de grau de pureza), cloreto de tributiltetradecilfosfônio ( $[P_{444(14)}]Cl$ ) (93% de grau de pureza), cloreto de trihexiltetradecilfosfônio ( $[P_{666(14)}]Cl$ ) (95% de grau de pureza), brometo de trihexiltetradecilfosfônio ( $[P_{666(14)}]Br$ ) (98% de grau de pureza), decanoato de trihexiltetradecilfosfônio ( $[P_{666(14)}]Deca$ ) (97% de grau de pureza), bis(2,4,4-trimetilpentil)fosfinato de trihexiltetradecilfosfônio ( $[P_{666(14)}]Phosp$ ) (98% de grau de pureza), bis(trifluorometilsulfonil)amida de trihexiltetradecilfosfônio ( $[P_{666(14)}]NTf_2$ ) (95% de grau de pureza). Todos os LIs foram produzidos pela Cytec Industries Inc. e fornecidos gentilmente pelo Departamento de Química da Universidade de Aveiro, em Portugal. Maiores detalhes das suas estruturas moleculares com respectivos nomes e abreviaturas são mostrados na Figura 8.

## CÁTIONS



## ÂNIONS

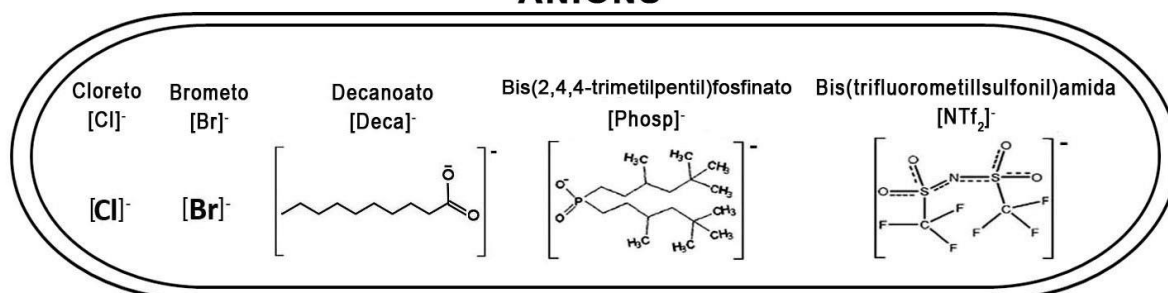
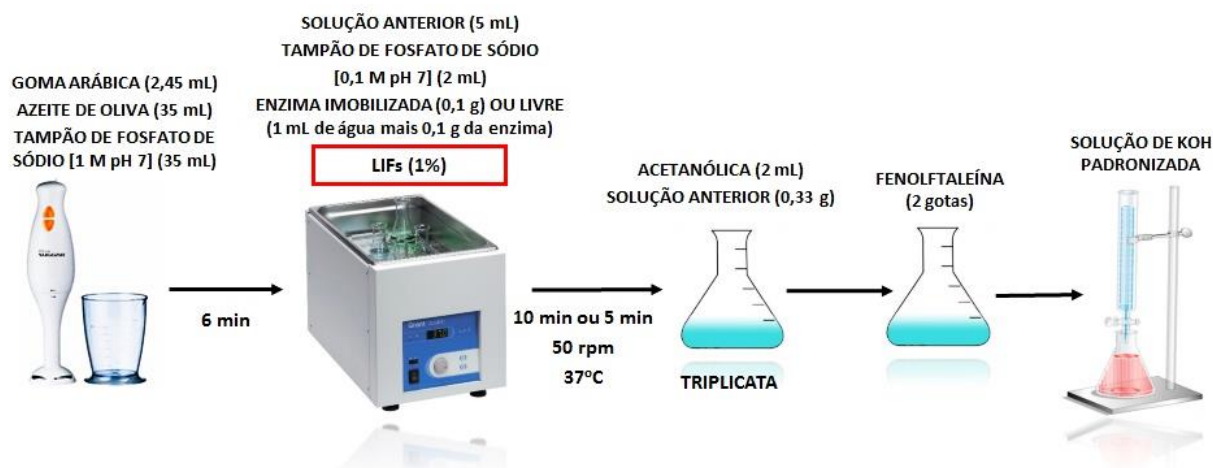


Figura 8: Líquidos iônicos à base de fosfônio utilizados neste estudo.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Atividade de hidrólise no azeite de oliva

Na reação de hidrólise do azeite de oliva foi determinada a atividade hidrolítica dos biocatalisadores, segundo o método descrito por Soares *et al.* (1999), como ilustrado na Figura 9. O substrato foi preparado pela emulsão de 35 mL de azeite de oliva e 35 mL tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 2,5 g de goma arábica. A reação enzimática foi formada por 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio e 1 mL de água Milli-Q para o branco, 1% (m/v) do líquido iônico e 1 mL de solução enzimática (0,1 g de LBC em 1 mL de água mili-Q) (Etapa 1) ou 0,1 g do biocatalisador imobilizado (Etapas 2 e 3). A temperatura da reação foi mantida a 37°C em agitação constante (50 rpm) por 5 e 10 min para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de KOH ± 0,04 N, utilizando fenolftaleína como indicador.



**Figura 9:** Metodologia de rendimento de imobilização e atividade de hidrólise em azeite de oliva.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera em 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por min de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em ( $1 \text{ U/g} = 1 \mu\text{moles/g.min}$ ) e calculadas por meio da Equação 1.

$$\text{Atividade Hidrolítica (U/g)} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times m} \quad (1)$$

onde  $V_a$  é o volume da amostra titulada (mL),  $V_b$  é o volume do branco titulado (mL),  $M$  é a molaridade da solução de KOH (mol/L),  $t$  é o tempo de reação em minutos e  $m$  é a massa da amostra utilizada na reação (g).

A atividade relativa da enzima foi calculada conforme Equação 2:

$$\text{Atividade Relativa (\%)} = \frac{\text{Atividade Hidrolítica}}{\text{Atividade inicial da enzima}} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.2.2. Sílica produzida pela técnica sol-gel

As matrizes de sílica foram preparadas empregando a metodologia anteriormente estabelecida (SOUZA *et al.*, 2013) com algumas modificações, como mostra a Figura 10. A solução etanólica, foi preparada dissolvendo 15 mL de Tetraetilortosilicato (TEOS) em 18 mL etanol em atmosfera inerte de nitrogênio e foi transferida para um balão de três bocas de 250 mL. A solução etanólica foi mantida sob agitação durante aproximadamente 5 min à temperatura ambiente. A esta solução adicionou-se lentamente (gota a gota), por meio de funil

de adição, 0,11 mL de ácido clorídrico diluído em 2,5 mL de água ultrapura. Após a lenta adição da solução pré-hidrolisante, a temperatura foi mantida a 35°C sob agitação, durante 80 min. Para as sílicas modificadas (Etapa 2), após esse período, adicionou-se 1% (m/v) dos líquidos iônicos à base de fosfônio: [P<sub>4444</sub>]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, [P<sub>444(14)</sub>]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, [P<sub>666(14)</sub>]<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, [P<sub>666(14)</sub>]<sup>+</sup>Deca<sup>-</sup>, [P<sub>666(14)</sub>]<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>, [P<sub>666(14)</sub>]<sup>+</sup>NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>, [P<sub>666(14)</sub>]<sup>+</sup>Phosp<sup>-</sup>) e aguardou-se 10 min. Na produção da sílica controle (sem LIFs) a etapa anterior não foi realizada. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de hidróxido de amônio dissolvido em 3 mL de etanol (solução hidrolisante), obtendo-se uma solução homogênea, e em seguida a mistura foi mantida em repouso à temperatura de 35°C durante 60 min. O material foi lacrado no balão e mantido sob condições estáticas e gelação durante 24h para completar a policondensação. Após este período, o gel foi retirado do balão de três bocas e transferido para o extrator Soxhlet, onde foi lavado com hexano por 6h, para eliminar a presença do LIF. Após a lavagem o material foi mantido em dessecador por 72h.

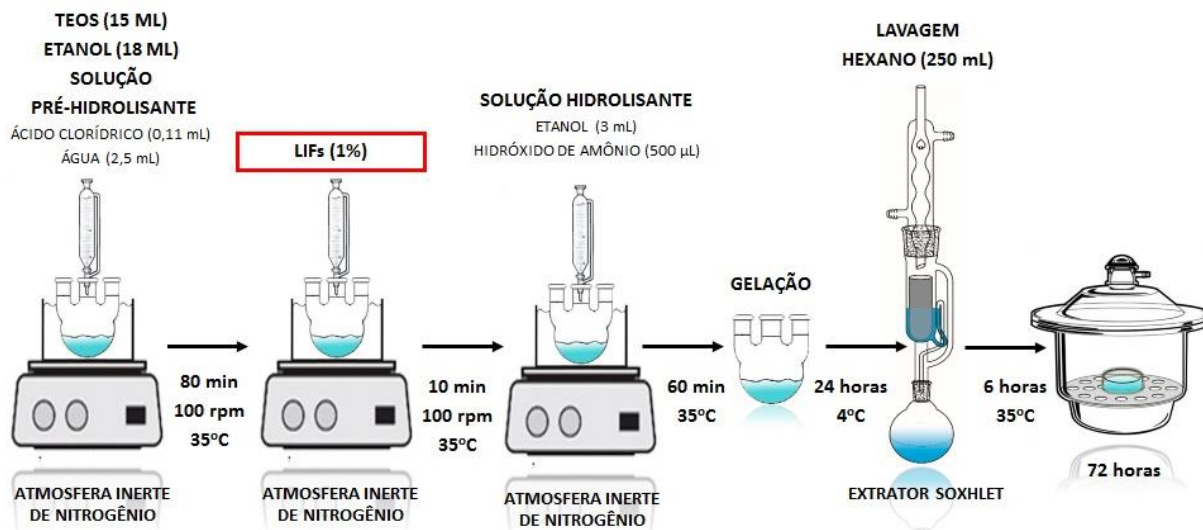
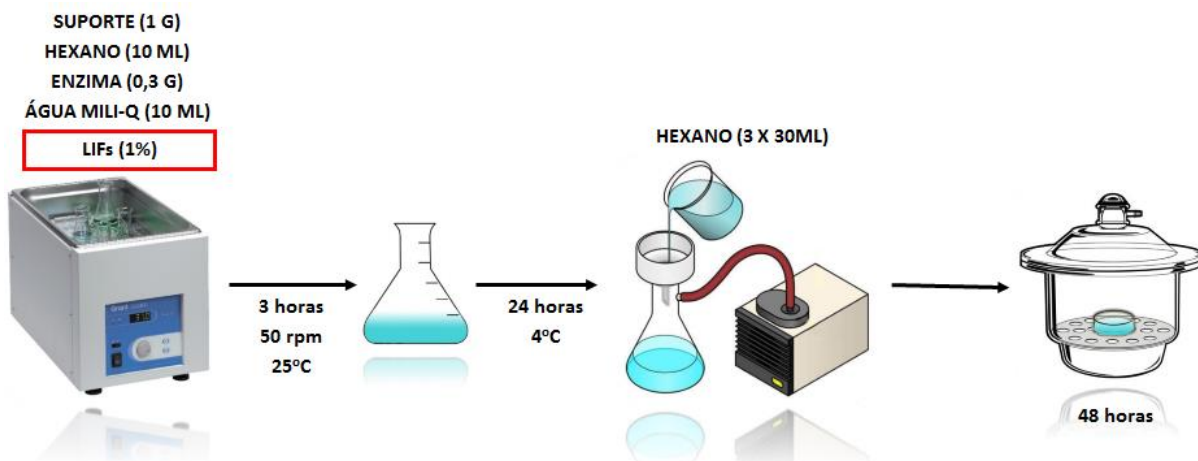


Figura 10: Metodologia da produção da sílica pela técnica sol-gel.

#### 4.2.3. Imobilização por adsorção física

A lipase *Burkholderia cepacia* foi imobilizada em sílica controle (Etapas 2 e 3) ou modificada com LIFs (Etapa 2) seguindo a técnica da adsorção física (ADS) conforme a metodologia de Soares *et al.* (2004), com modificações (Figura 11). De forma geral, 10 mL de hexano foi adicionado a 1 g do suporte com agitação vigorosa à temperatura ambiente durante 15 min. Em seguida, adicionou-se 10 mL da solução enzimática (0,3 g de LBC em 10 mL de água Milli-Q) e, para verificar os efeitos dos LIFs durante o processo de imobilização, adicionou-se 1% dos líquidos iônicos à base de fosfônio (Etapa 3). O processo de imobilização

foi mantido sob agitação de 50 rpm por 3h, na sequência o material é deixado em gelação por 24h. Posteriormente, a LBC immobilizada foi lavada por 3 vezes com 30 mL de hexano, recuperada por filtração sob vácuo e mantida por 48h em dessecador.



**Figura 11:** Metodologia do processo de imobilização por adsorção física.

#### 4.2.4. Rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização de todos os biocatalisadores imobilizados (Etapas 2 e 3) foi calculado com base na metodologia descrita no item 4.2.1, por meio da Equação 3:

$$\text{Rendimento de Imobilização (\%)} = \frac{U_s}{U_o} \times 100 \quad (3)$$

onde  $U_s$  indica a unidade de atividade hidrolítica total presente no biocatalisador e  $U_o$  é a unidade de atividade hidrolítica oferecida para imobilização.

### 4.3. CARACTERIZAÇÕES

#### 4.3.1. Caracterização morfológica

As áreas superficiais das sílicas controle e modificada com LIFs e dos BIs foram calculadas de acordo com o método Brunauer-Emmett-Teller (BET) (BRUNAUER *et al.*, 1938). O volume de poros ( $V_p$ ) e diâmetro médio dos poros ( $D_p$ ) foram calculados por meio do método desenvolvido por Barret, Joyner e Halenda (BJH) (RAMOS *et al.*, 1998), sendo em

seguida analisados pelo software BET (Modelo NOVA 1200e - Área de Superfície e Analisador de Tamanho de Poro, Quantschrome Instruments, versão 11.0), utilizando adsorção de N<sub>2</sub> à 77 K. Antecipadamente, as amostras foram submetidas a tratamento térmico em estufa à 120°C por 48h, para eliminar a água existente no interior dos poros dos sólidos.

As micrografias foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo JSM6510 LV, nas dimensões de 100x, 200x, 500x, 1000x e 2000x. O MEV é um método que tem como princípio de funcionamento a emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), por meio de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV, capaz de produzir imagens de alta resolução (KESTENBACH *et al.*, 1997).

#### **4.3.2. Caracterização físico-química**

As caracterizações físico-químicas das sílicas e os biocatalisadores imobilizados foram realizadas por meio dos métodos de Termogravimetria (TG) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

A termogravimetria é uma análise térmica fundamentada na variação de massa de uma determinada amostra, resultante de uma transformação química (oxidação, degradação, decomposição) ou física (evaporação, condensação, sublimação) em função do tempo (a uma temperatura constante) ou da temperatura. A variação de massa é medida com o uso de um equipamento chamado termobalança, que é constituído de um programador linear de temperatura acoplado em uma microbalança eletrônica, onde a amostra é resfriada ou aquecida durante a pesagem (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002). Neste estudo, as curvas termogravimétricas foram obtidas através do equipamento Shimadzu DTG-60H (DTA-TG simultâneo) sob atmosfera de nitrogênio, iniciando as curvas a partir da temperatura ambiente até 1000°C a uma taxa de aquecimento de 20°C/min.

O método de espectroscopia no infravermelho é baseado nas frequências de vibração específicas dos átomos que formam as moléculas, que variam de acordo com a estrutura, composição e o modo de vibração da amostra. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier possibilita que o espectro seja obtido de forma mais rápida. Ao invés de se coletar os dados variando a frequência da radiação infravermelha, a radiação é guiada

através de um interferômetro. Por meio de uma transformada de Fourier no sinal, obtêm-se um espectro idêntico ao da espectroscopia convencional. A estrutura química superficial das amostras analisadas neste trabalho foi indicada por meio do espectrômetro FTIR de refletância total atenuada (marca Perkin Elmer), nas faixas entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$ .



### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

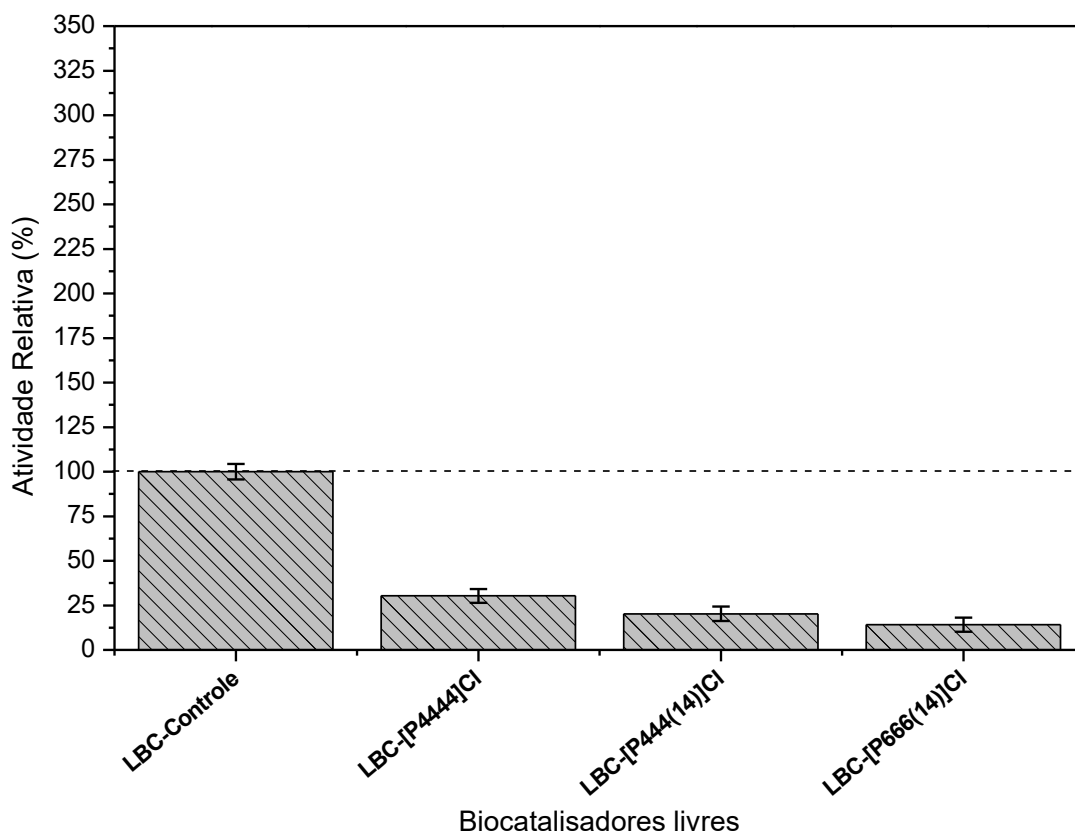
Os resultados descritos neste capítulo estão divididos em três diferentes etapas. Inicialmente, são apresentados e discutidos os resultados obtidos em relação aos efeitos dos líquidos iônicos à base de fosfônio aplicados na lipase *Burkholderia cepacia* livre. Na segunda etapa, são expostos e discutidos os resultados referente ao comportamento da *Burkholderia cepacia* imobilizada por adsorção física em sílicas modificadas com líquidos iônicos à base de fosfônio, onde também são apresentadas as caracterizações morfológica e físico-química dos biocatalisadores imobilizados. Na terceira e última etapa, são exibidos e discutidos os resultados relacionados aos efeitos dos líquidos iônicos à base de fosfônio quando adicionados como aditivos durante o processo de imobilização por adsorção física da *Burkholderia cepacia*. Estes efeitos são correlacionados com as características morfológicas e físico-químicas dos biocatalisadores imobilizados.

#### 5.1. EFEITOS DOS LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO NA LIPASE *Burkholderia cepacia* LIVRE

Nesta seção são discutidos os efeitos dos LIFs sobre a atividade enzimática da lipase *Burkholderia cepacia* aplicada na reação de hidrólise do azeite de oliva (Etapa 1). Verificou-se a influência do comprimento da cadeia catiônica e do tipo de ânion na atividade da enzima.

##### 5.1.1. Efeito do comprimento da cadeia catiônica na atividade da lipase *Burkholderia cepacia* livre

A Figura 12 mostra o efeito dos líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo ânion  $[Cl]^-$  com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  e  $[P_{666(14)}]^+$ ) sobre a atividade da lipase *Burkholderia cepacia* livre. Os resultados indicaram que a inativação da LBC se tornou mais expressiva na presença do líquido iônico com cadeia catiônica mais longa, seguindo a tendência:  $[P_{4444}]Cl < [P_{444(14)}]Cl < [P_{666(14)}]Cl$ .



**Figura 12:** Atividade relativa da lipase *Burkholderia cepacia* na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo ânion  $[Cl]^-$  com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  e  $[P_{666(14)}]^+$ ).

Alguns estudos sugerem que o aumento da cadeia catiônica induz maiores interações do LI com a estrutura da proteína e, a depender das propriedades físico-química do ânion associado ao cátion do LI, pode promover a sua deformação estrutural, com consequente inativação enzimática (ATTRI, *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015). Líquidos iônicos sintetizados com ânions mais hidrofílicos podem perturbar ligações de hidrogênio e interagir fortemente com a enzima, promovendo a mudança conformacional na sua estrutura e, consequentemente, influenciando na sua atividade e estabilidade (NAUSHAD *et al.*, 2012). O ânion  $[Cl]^-$  possui forte capacidade de formar ligações de hidrogênio e, por essa razão pode interagir com grupamentos polares da enzima e desestabilizar a sua estrutura (KLAHN *et al.*, 2011; CLAUDIO *et al.*, 2014). Este fato pode justificar a diminuição da atividade catalítica da lipase *Burkholderia cepacia* na presença dos LIFs  $[P_{4444}]Cl$ ,  $[P_{444(14)}]Cl$ ,  $[P_{666(14)}]Cl$ .

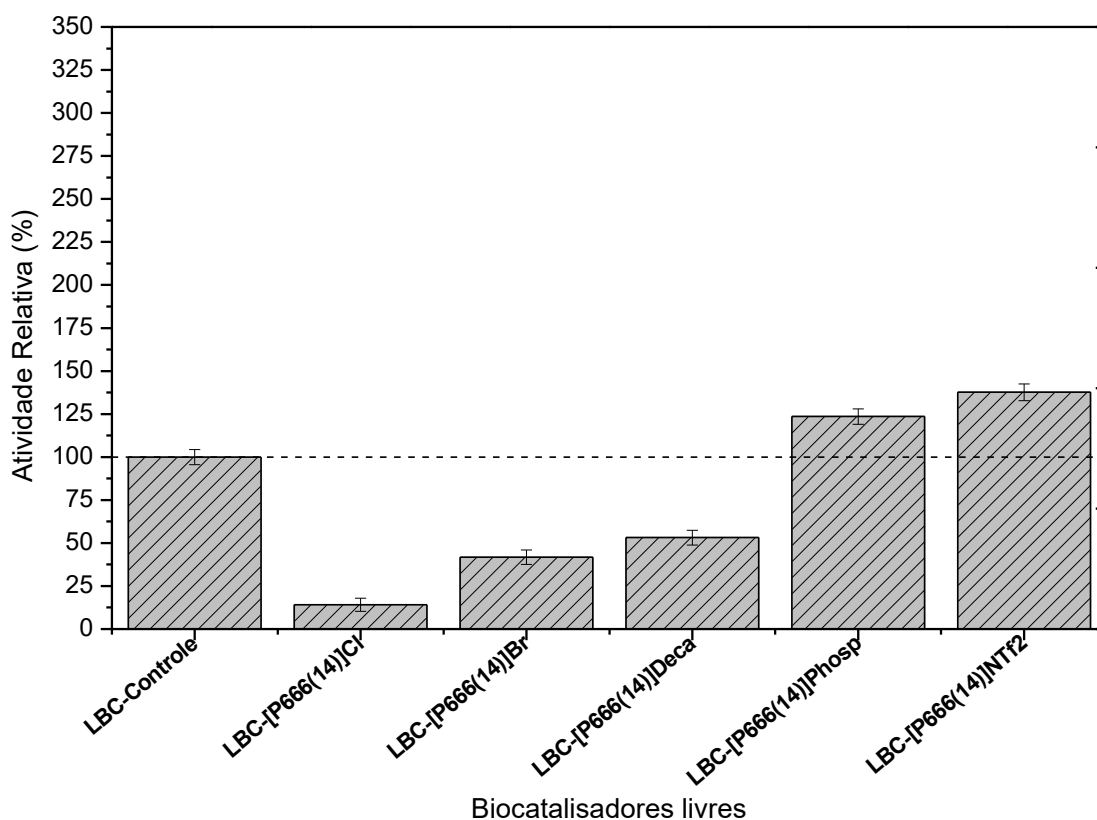
A consistência destes dados também pode ser verificada no estudo de Ventura *et al.* (2012), que utilizaram a lipase B *Candida antarctica* na presença de líquidos iônicos com cátions de diferentes comprimentos de cadeias catiônicas. Os autores descreveram que o efeito do aumento na cadeia catiônica sobre a atividade está relacionado com a natureza hidrofóbica da cadeia lateral do cátion associado à ânions de natureza hidrofílica, que promove a capacidade

do líquido iônico para modificar a estrutura da proteína e, conseqüentemente, diminuir a atividade enzimática (KLAHN *et al.*, 2011).

Outra justificativa pode ser atribuída ao fato de que a viscosidade do líquido iônico torna-se maior com o aumento do comprimento da cadeia catiônica para um ânion fixo, devido às fortes interações de van der Waals. A literatura relata que a viscosidade do líquido iônico também pode afetar a atividade e a estabilidade da enzima, isso porque o aumento da viscosidade diminui a velocidade das reações biocatalíticas devido à limitação de transferência de massa (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010).

### 5.1.2. Efeito do ânion na atividade da lipase *Burkholderia cepacia* livre

A fim de elucidar a influência do cátion com cadeia catiônica mais longa ( $[P_{666(14)}]^+$ ) combinado com diferentes ânions sobre a atividade da LBC, a Figura 13 ilustra o comportamento da atividade relativa da LBC na presença dos LIFs de mesmo cátion  $[P_{666(14)}]^+$  com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ).



**Figura 13:** Atividade relativa da lipase *Burkholderia cepacia* na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo cátion  $[P_{666(14)}]^+$  com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ).

Estudos relatam que o efeito do ânion sobre a perda de atividade enzimática está associado à capacidade dos íons de formar ligações de hidrogênio com a proteína, além de outras forças intermoleculares que ocorrem entre os íons do LI e os resíduos de aminoácidos da enzima (LUNGWITZ e SPANGE, 2008; LUNGWITZ *et al.*, 2010; KLAHN *et al.*, 2011; VENTURA *et al.*, 2012). Os líquidos iônicos com os ânions  $[\text{Cl}]^-$ ,  $[\text{Br}]^-$  e  $[\text{Deca}]^-$  apresentaram efeito negativo para a atividade enzimática. De acordo com a série de Hofmeister, os ânions  $[\text{Cl}]^-$  e  $[\text{Br}]^-$  são altamente hidratados, formados na sua maior parte por íons caotrópicos, que geralmente atuam no sentido de desestabilizar a estrutura da proteína (HOFMEISTER *et al.*, 1988, YANG, 2009). Entre os ânions estudados, o  $[\text{Cl}]^-$  apresenta a mais forte basicidade de ligação de hidrogênio e, como um bom aceitador, este ânion possibilita uma forte polarização de carga interna que gera grandes cargas parciais sobre os átomos polares que coordenam diretamente a enzima, por meio de fortes ligações de hidrogênio. Estas interações com os sítios carregados positivamente na estrutura enzimática podem provocar a sua desnaturação e consequente redução da atividade (GAO *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2016).

Entretanto, pode-se observar que a seleção dos ânions  $[\text{Phosp}]^-$  e  $[\text{NTf}_2]^-$  promoveu efeito positivo para a atividade da lipase. Especialmente para o  $[\text{NTf}_2]^-$ , que apresentou acréscimo de 37,6%, em relação à atividade inicial da LBC livre de solvente (LBC-Controle). Neves *et al.* (2011), analisaram as propriedades termofísicas dos líquidos iônicos  $[\text{P}_{666(14)}]\text{Cl}$ ,  $[\text{P}_{666(14)}]\text{Br}$ ,  $[\text{P}_{666(14)}]\text{Deca}$ ,  $[\text{P}_{666(14)}]\text{Phosp}$ ,  $[\text{P}_{666(14)}]\text{NTf}_2$ ,  $[\text{P}_{666(14)}]\text{CH}_3\text{SO}_3$  e  $[\text{P}_{666(14)}]\text{N}(\text{CN})_2$ , e seus resultados indicaram o  $[\text{P}_{666(14)}]\text{NTf}_2$  é o LI mais hidrofóbico estudado. Este fato pode justificar o acentuado efeito positivo para a atividade da LBC na presença deste líquido iônico, uma vez que estudos afirmam que LIs mais hidrofóbicos tendem a manter a estrutura proteica e preservar a camada de hidratação em torno da enzima e, ao mesmo tempo, facilitar o acesso do substrato ao sítio catalítico, favorecendo assim a hiperativação interfacial da enzima (COLLINS *et al.*, 2007; ZHAO, 2016).

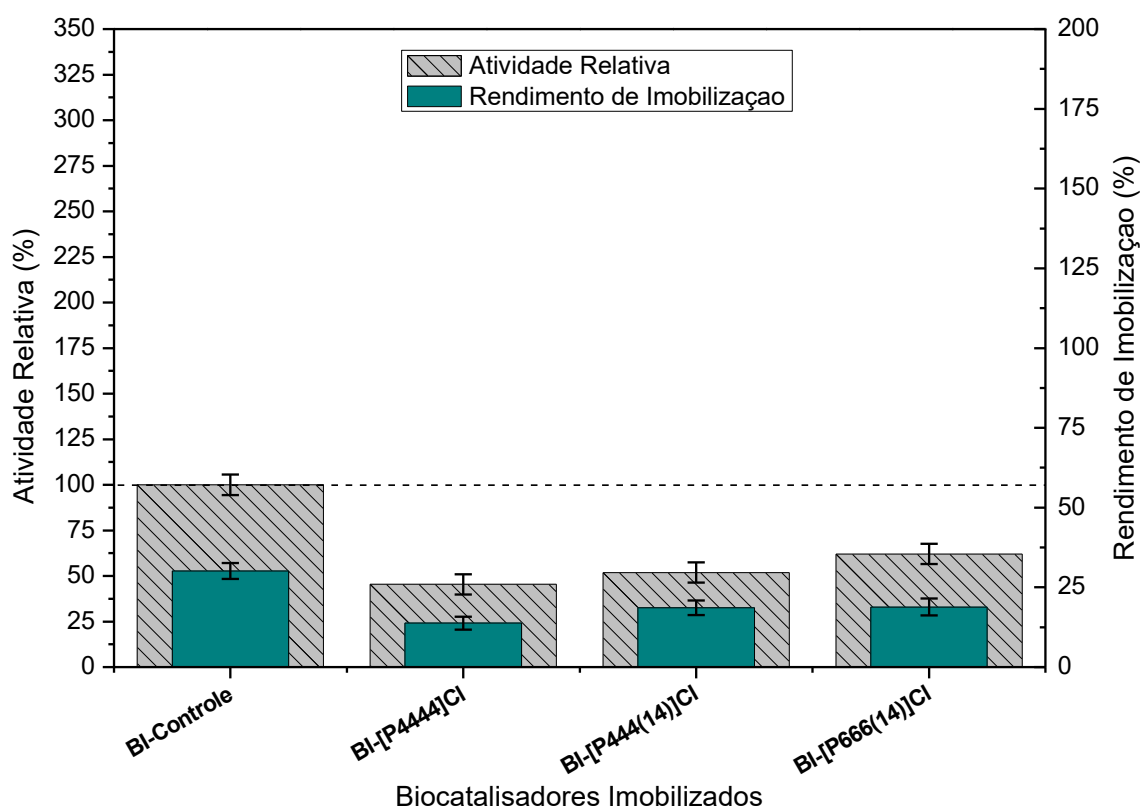
## **5.2. EFEITOS DOS LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO COMO AGENTES DE MODIFICAÇÃO DA SÍLICA**

Nesta seção são discutidos os resultados a respeito da atividade relativa e do rendimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada pela técnica de adsorção física em sílica controle e em sílica modificada com líquidos iônicos à base de fosfônio, verificando a

influência do comprimento da cadeia catiônica e do tipo de ânion (Etapa 2). Além disso, são avaliados os resultados obtidos por meio das caracterizações morfológica e físico-química da sílica controle, da sílica modificada com LIFs e dos biocatalisadores imobilizados em sílica controle e modificada com LIFs.

### 5.2.1. Efeito do comprimento da cadeia catiônica na modificação superficial da sílica

A Figura 14 mostra o comportamento da atividade relativa e o rendimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica controle e modificada com líquidos iônicos à base de fosfônio com mesmo ânion  $[Cl]^-$  e diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  e  $[P_{666(14)}]^+$ ).



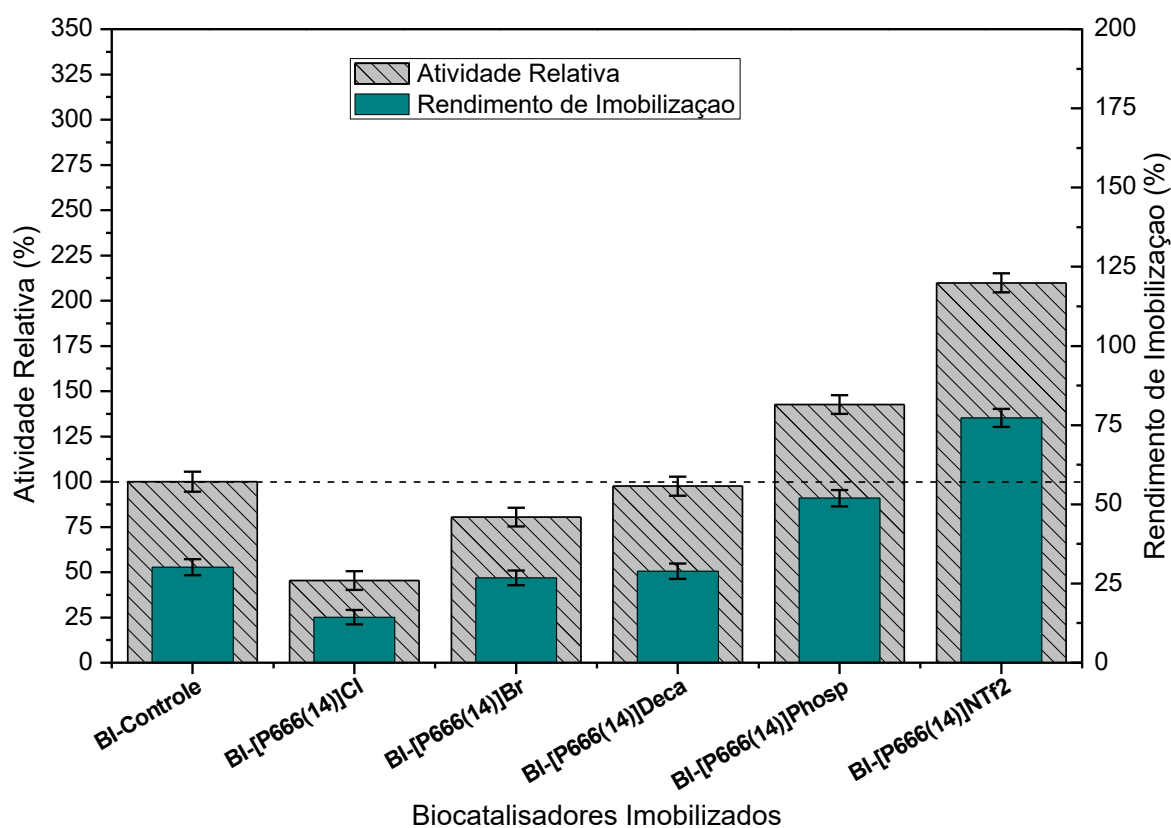
**Figura 14:** Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica controle e modificada com líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo ânion  $[Cl]^-$  com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  e  $[P_{666(14)}]^+$ ).

O desempenho catalítico do biocatalisador imobilizado é diretamente dependente das características da superfície do suporte, tais como área superficial, volume e tamanho dos poros, além do caráter hidrofóbico (CARVALHO *et al.*, 2014). De acordo com os dados obtidos, o uso destes LIFs para a modificação superficial da sílica promoveu efeitos negativos tanto para a atividade relativa quanto para o rendimento de imobilização. Contudo, contrariamente aos resultados obtidos com a lipase *Burkholderia cepacia* livre, os LIFs formulados com cátions de

cadeias catiônicas menores promoveram maior efeito negativo sobre os biocatalisadores imobilizados, como se segue:  $[P_{666(14)}]Cl < [P_{444(14)}]Cl < [P_{4444}]Cl$ . Uma vez que não houve diferença significativa nos valores de atividade relativa e rendimento de imobilização, provavelmente, a natureza hidrofílica do ânion  $[Cl]^-$  tenha sido o fator principal, que provocou alterações nos microambientes dos poros, além de diminuir o volume e o tamanho dos mesmos, o que reduziu a acessibilidade do substrato devido à limitação difusional. Consequentemente, estes fatores afetaram as características da enzima, reduzindo o seu desempenho catalítico (QUIRÓS *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2014).

### 5.2.2. Efeito do ânion na modificação superficial da sílica

A Figura 15 exibe os resultados a respeito da atividade relativa e do rendimento de imobilização da LBC imobilizada por adsorção física em sílica controle e modificada com líquidos iônicos à base de fosfônio com mesmo cátion  $[P_{666(14)}]^+$  e diferentes ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ).



**Figura 15:** Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica controle e modificada com líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo cátion  $[P_{666(14)}]^+$  com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ).

Os dados obtidos mostram que a utilização dos LIFs com diferentes ânions na modificação superficial da sílica promoveu influência tanto positiva quanto negativa na atividade enzimática e rendimento de imobilização da LBC imobilizada nestes suportes, a depender do ânion. Para a LBC imobilizada em sílica modificada com o LIFs com ânions de natureza hidrofílica ( $[P_{666(14)}]Cl$ ,  $[P_{666(14)}]Deca$  e  $[P_{666(14)}]Br$ ), observou-se uma diminuição na atividade relativa e no rendimento de imobilização da lipase. Quando comparado ao controle, o efeito negativo foi mais acentuado para a LBC imobilizada em sílica modificada com LIF sintetizado com o ânion  $[Cl]^-$ , com redução de 54% na atividade relativa e 17% no rendimento de imobilização.

Para a LBC imobilizada em sílica modificada com LIFs com ânions de natureza hidrofóbica ( $[P_{666(14)}]Phosp$   $[P_{666(14)}]NTf_2$ ), notou-se efeitos positivos para a imobilização da enzima, com destaque para o biocatalisador imobilizado em sílica produzida com LIF sintetizado com o ânion  $[NTf_2]^-$ , que quando comparado ao biocatalisador imobilizado em sílica controle, apresentou aumento na atividade relativa de 100% para 209,8%, bem como no rendimento de imobilização, que passou de 30,16% para 77,26%. Sugere-se que a modificação superficial causada pelo LIF mais hidrofóbico ( $[P_{666(14)}]NTf_2$ ), promoveu o aumento do tamanho e volume dos poros da sílica e tornou o microambiente favorável à enzima, aumentando a acessibilidade do substrato e induzindo a hiperativação interfacial da lipase imobilizada neste suporte. A consistência destes resultados pode ser verificada no estudo de revisão de MATEO *et al.* (2007), onde os autores relatam que microambientes mais hidrofóbicos são benéficos à atividade de lipases, além de aumentar a afinidade entre a enzima e o substrato, com efeito positivo para a reação de hidrólise.

Após a verificação do aumento na atividade relativa e rendimento de imobilização, selecionou-se o biocatalisador imobilizado em sílica controle e modificada com melhor resultado BI- $[P_{666(14)}]NTf_2$  para realizar as caracterizações morfológicas e físico-químicas.

### **5.2.3. Caracterização morfológica**

As características morfológicas do suporte, tais como área superficial, diâmetro e volume dos poros desempenham um importante papel a respeito da eficiência do processo de imobilização (ZHOU e HARTMMANN, 2013). Dessa forma, por meio do método BET foram realizadas análises para determinação da área superficial, volume e diâmetro de poros de sílica

controle e modificada com [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, além dos biocatalisadores imobilizados.

Os resultados expostos na Tabela 6 indicam que houve diminuição na área de superfície da sílica modificada com o líquido iônico, de 802,7 m<sup>2</sup>/g na Sílica-Controle para 733,58 m<sup>2</sup>/g na Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, e ambos os materiais têm uma área superficial relativamente grande. Essa diminuição está de acordo com os estudos de Yang *et al.* (2013) e Hu *et al.* (2012), e pode ser atribuída às alterações de domínios do suporte e a redistribuição dos grupos funcionais na superfície da sílica provocadas pela presença do aditivo. No entanto, notou-se aumento significativo tanto para o volume dos poros (de 0,93 cm<sup>3</sup>/g para 4,08 cm<sup>3</sup>/g) quanto para o diâmetro dos poros (de 1,92 para 6,36 nm).

**Tabela 6:** Área superficial, volume de poros e diâmetro de poros da sílica controle e modificada com [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> e dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física.

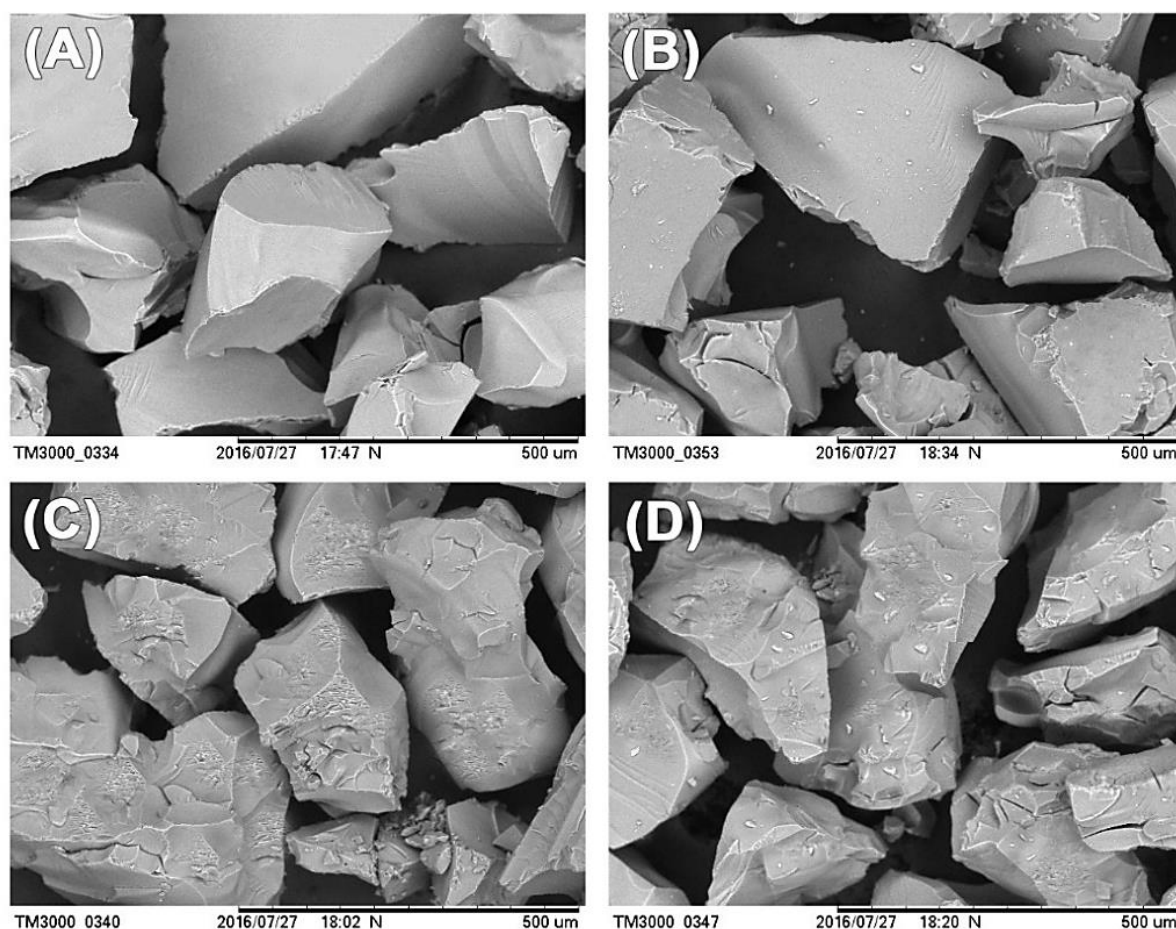
| <b>Amostras</b>                                | <b>Área Superficial<br/>(m<sup>2</sup>/g)</b> | <b>Volume dos Poros<br/>(cm<sup>3</sup>/g)</b> | <b>Diâmetro dos Poros<br/>(nm)</b> |
|--|---|--|------------------------------------|
| Sílica-Controle                                | 802,71 ± 5,46                                 | 0,93 ± 0,08                                    | 1,92 ± 0,23                        |
| BI-Controle                                    | 701,2 ± 4,61                                  | 0,91 ± 0,06                                    | 1,82 ± 0,18                        |
| Sílica-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> | 733,58 ± 4,77                                 | 4,08 ± 0,59                                    | 6,36 ± 0,78                        |
| BI-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub>     | 378,4 ± 2,11                                  | 1,46 ± 0,14                                    | 3,71 ± 0,39                        |

Segundo Kim *et al.* (1997), a LBC é uma proteína com dimensões moleculares de aproximadamente 3nm × 4nm × 5nm. Para a Sílica-Controle, o diâmetro dos poros (1,92 nm) pode não é grande o suficiente para fornecer acesso para a lipase, sendo provável que a mesma seja adsorvida na entrada ou nas proximidades dos poros. No caso da Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, o diâmetro dos poros (6,36 nm) é maior do que a maior dimensão da lipase, o que possibilita o acesso mais fácil para a LBC. Estes resultados indicam que as propriedades do [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> influenciaram positivamente a modificação da sílica. Segundo Jaladi *et al.* (2009), a adsorção de lipase *Burkholderia cepacia* é ligeiramente dependente do tamanho dos poros do suporte.



No que diz respeito aos biocatalisadores imobilizados (BI-Controle e BI-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>), notou-se a diminuição de todos os parâmetros analisados quando comparados aos dos suportes (Sílica-Controle e Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>), com diferença mais acentuada para a LBC imobilizada em sílica modificada (BI-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>). Na literatura, é possível observar a mesma tendência de diminuição de área superficial, volume e diâmetro dos poros do suporte após a imobilização do biocatalisador (ZOU *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013). Assim, pode ser visto que a utilização do líquido iônico à base de fosfônio ([P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) influenciou positivamente no processo de imobilização, conforme evidenciado pela atividade relativa e rendimento de imobilização de biocatalisador imobilizado em Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>.

A Figura 16A-D mostra as micrografias da sílica controle, da sílica modificada com [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> e dos biocatalisadores imobilizados em sílica controle e modificada (BI-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>).



**Figura 16:** Microscopia eletrônica de varredura para: (A) Sílica Controle (x200), (B) Biocatalisador imobilizado com sílica controle (x200), (C) Sílica modificada com [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> (x200), e (D) Biocatalisador imobilizado com sílica modificada com [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> (x200).

A partir destas imagens pode ser analisada a morfologia geral das amostras, que sugerem

que a presença do LIF [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> durante a produção da sílica promoveu uma maior formação de fissuras na sua superfície (Figura 16A e 16C), o que pode ter facilitado a adsorção física da enzima neste suporte. Estas observações estão de acordo com o que foi descrito no estudo de Zou *et al.* (2014), no qual os autores relataram que a modificação causada pelo aditivo não destruiu a estrutura da sílica, mas promoveu pequenas alterações na sua superfície porosa motivada pela carga de líquido iônico presente durante a sua produção, sendo crucial para melhorar a atividade enzimática e o rendimento de imobilização. Assim, demonstrou-se que o uso do líquido iônico ([P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) na modificação superficial da sílica influenciou de forma benéfica a sua morfologia, subseqüentemente, no processo de imobilização da lipase (SERRA *et al.*, 2010; MAHMOUD e AL-BISHRI, 2011).

#### 5.2.4. Caracterização físico-química

As análises termogravimétricas fornecem informações sobre a composição por meio da perda de massa da LBC, sílica controle e modificada com [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> e dos BIs. Os termogramas foram divididos em três regiões: Região I, cuja temperatura está entre 25 e 200°C, onde a perda de massa está associada especialmente à decomposição de grupos amino e a moléculas de água. A sílica obtida pela técnica de sol-gel contém muitos grupos Si-OH que podem absorver água com facilidade (Wu *et al.*, 2012). Na Região II, que abrange entre 200 e 400°C, a perda está associada aos componentes orgânicos (C, O, H e N), a decomposição biológica, incluindo a lipase e a presença de grupos silanóis do TEOS que não realizou a interação entre a enzima e o suporte, presentes na sílica devido à incompleta reação sol-gel. Na Região III, entre 400 e 1000°C, a perda de massa é associada com as reações desidroxilação finais e de carbonização final de compostos orgânicos, acarretando na degradação completa do material (SOARES *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2009).

Pode-se observar na Tabela 7 que, para a sílica modificada com o LIF [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, observou-se uma perda de massa total um pouco inferior a Sílica-Control, cerca de 19,14%. SOARES *et al.* (2004), correlacionam essa menor perda de massa obtida para o suporte modificado com aditivo com o aumento da estabilidade térmica do material, resultante das interações entre os grupamentos da sílica e os componentes do LI. Em concordância, a perda de massa correspondente à Região I foi pouco maior para Sílica-Control (17,77%) quando comparada a Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> (16,07%), sugerindo que a presença do LIF hidrofóbico

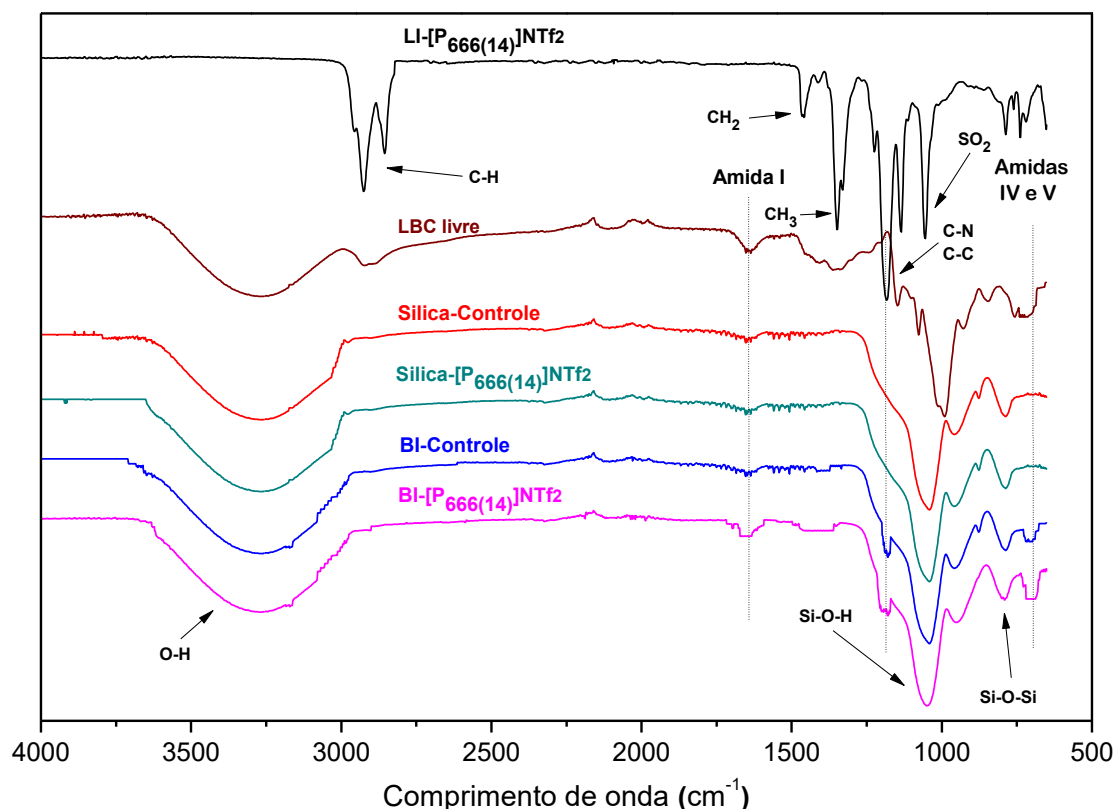
promoveu uma menor adsorção de moléculas de água residual nos interstícios da rede porosa da sílica modificada (VILA-REAL *et al.*, 2011; ABAHAZI *et al.*, 2014).

**Tabela 7:** Perda de massa parcial e total da lipase *Burkholderia cepacia*, da sílica controle e modificada com [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> e dos biocatalisadores imobilizados.

| <b>Amostras</b>                                | <b>Região I<br/>(25 – 200°C)</b> | <b>Região II<br/>(200 – 400°C)</b> | <b>Região III<br/>(400 – 1000°C)</b> | <b>Perda total de<br/>massa (%)</b> |
|--|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| LBC  | 8,56 ± 0,71                      | 87,42 ± 4,53                       | 3,64 ± 0,13                          | 99,62 ± 5,37                        |
| Sílica-Controle                                | 17,77 ± 1,07                     | 2,16 ± 0,10                        | 0,67 ± 0,02                          | 20,60 ± 1,19                        |
| BI-Controle                                    | 18,25 ± 1,34                     | 4,42 ± 0,21                        | 1,65 ± 0,07                          | 24,32 ± 1,62                        |
| Sílica-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> | 16,07 ± 1,05                     | 2,04 ± 0,08                        | 1,03 ± 0,04                          | 19,14 ± 1,17                        |
| BI-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub>     | 17,90 ± 1,11                     | 4,97 ± 0,31                        | 2,02 ± 0,08                          | 24,89 ± 1,50                        |

No que diz respeito aos biocatalisadores imobilizados, notou-se um pequeno aumento na perda de massa total para ambas as amostras, com cerca de 24,32% para BI-Controle e 24,89% para BI-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>. Estes resultados sugerem que o aumento esteja relacionado com a presença da lipase imobilizada, pois foi observada uma perda de massa maior para os BIs em relação aos suportes na Região II, a qual está associada à decomposição de componentes orgânicos (MUKHERJEE *et al.*, 2009). Isto corrobora com os dados demonstrados na caracterização morfológica, uma vez que o acréscimo de lipase imobilizada é associado ao aumento do tamanho e volume dos poros.

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi utilizada para analisar a composição química superficial das amostras Sílica-Controle, Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, BI-Controle e BI-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>. A partir da Figura 17 pode-se observar a presença das bandas características de sílica produzida pela matriz sol-gel, como os grupamentos Si-O-Si (800 e 1000 cm<sup>-1</sup>), Si-OH (entre 900 e 1100 cm<sup>-1</sup>) e grupos -OH (entre 3400 e 3500 cm<sup>-1</sup>), que indicam a formação das ligações da sílica e a polimerização do alcoóxido TEOS, durante a formação da matriz de sílica (SOARES *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2013; ANUAR *et al.*, 2013).



**Figura 17:** Espectros de FTIR da LBC, dos suportes de sílica controle e sílica modificada com  $[P_{666(14)}]NTf_2$ , e dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física.

Por meio dos espectros de  $LI-[P_{666(14)}]NTf_2$  e  $Sílica-[P_{666(14)}]NTf_2$  nota-se que todo líquido iônico foi removido durante a lavagem da sílica usando soxhlet com hexano, uma vez que não foi observada a presença de bandas características do  $LI-[P_{666(14)}]NTf_2$  no suporte modificado,  $SO_2$  (entre  $1050-1230\text{ cm}^{-1}$ ),  $CH_2$  ( $1460\text{ cm}^{-1}$ ),  $CH_3$  ( $1350\text{ cm}^{-1}$ ) e  $CH$  (entre  $2840-2920\text{ cm}^{-1}$ ). No que diz respeito a eficiência da imobilização da lipase no suporte controle e modificado com  $[P_{666(14)}]NTf_2$ , nota-se a presença de espectros típicos de proteínas, com bandas características de amida, grupos IV e V ( $695\text{ cm}^{-1}$ ), amida I (entre  $1600\text{ e }1700\text{ cm}^{-1}$ ), além de compostos da lipase, como C-C e C-N (entre  $1000-1100\text{ cm}^{-1}$ ), que podem ser observados nos espectros dos BI-Controle e  $BI-[P_{666(14)}]NTf_2$ , confirmando a imobilização da LBC nos suportes analisados (PORTACCIO *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012).

### 5.3. EFEITOS DOS LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO COMO ADITIVOS DURANTE A IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO FÍSICA

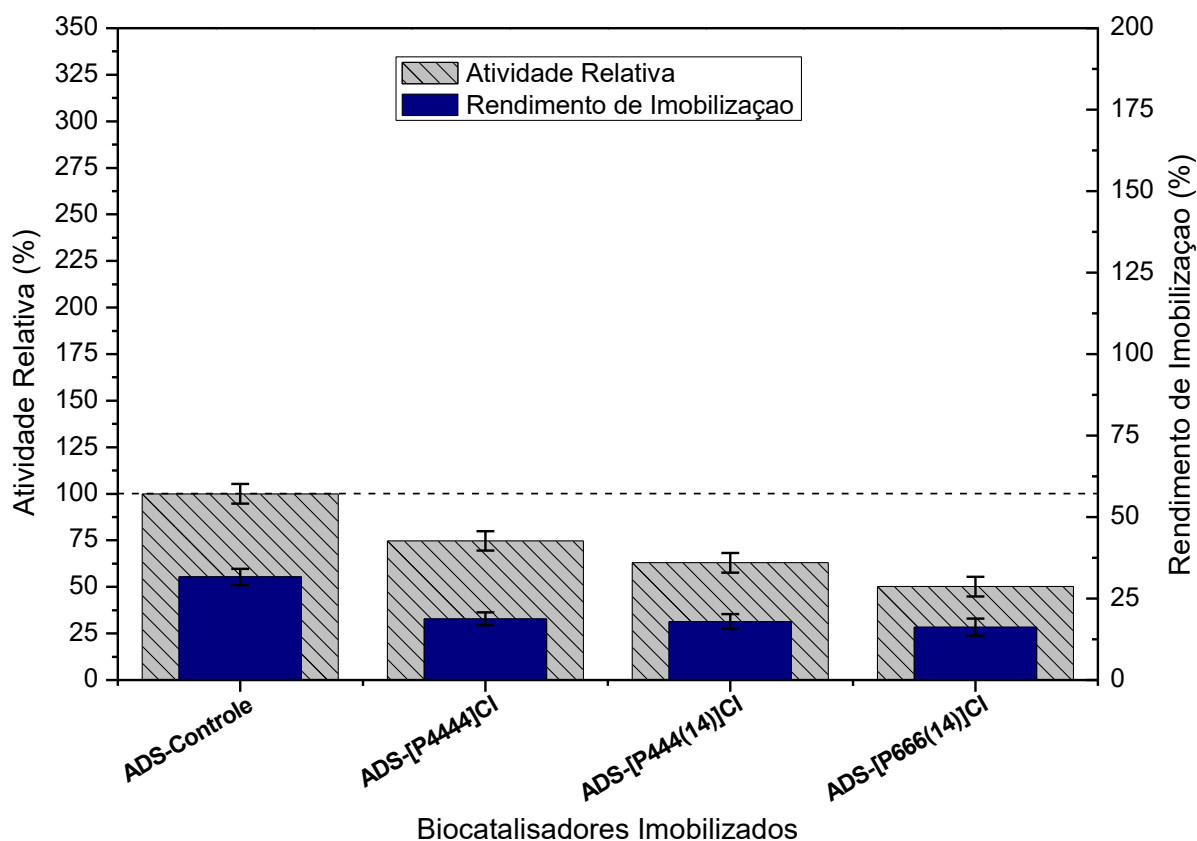
Nesta seção é investigada a influência de líquidos iônicos à base de fosfônio com distintos comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]Cl$ ,  $[P_{444(14)}]Cl$  e  $[P_{666(14)}]Cl$ ) e diferentes ânions ( $[P_{666(14)}]Cl$ ,  $[P_{666(14)}]Br$ ,  $[P_{666(14)}]Deca$ ,  $[P_{666(14)}]Phosp$  e  $[P_{666(14)}]NTf_2$ ), como aditivos na imobilização por adsorção física da lipase *Burkholderia cepacia* (Etapa 3), em sílica controle sem modificação com LIFs. Além da atividade relativa e rendimento de imobilização, são discutidos os resultados quanto as características morfológicas e físico-químicas dos biocatalisadores imobilizados controle e na presença dos LIFs.

#### 5.3.1. Efeito do comprimento da cadeia catiônica na imobilização por adsorção física

A partir da Figura 18, pode-se observar que a adição dos líquidos iônicos à base de fosfônio com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{4444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  e  $[P_{666(14)}]^+$ ) e mesmo ânion  $[Cl]^-$  promoveu efeito negativo tanto na atividade relativa quanto no rendimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica controle.

Nota-se que o efeito negativo se tornou mais significativo para as cadeias catiônicas mais longas, seguindo a tendência  $[P_{666(14)}]Cl > [P_{444(14)}]Cl > [P_{4444}]Cl$ . Este fato pode ser justificado porque líquidos iônicos com cátions de cadeias catiônicas longas possuem maior capacidade de interagir e modificar a estrutura conformacional da enzima (ATTRI *et al.*, 2011). No entanto, a variação do comprimento da cadeia catiônica para os LIFs utilizados não causou diferenças significativas no processo de imobilização.

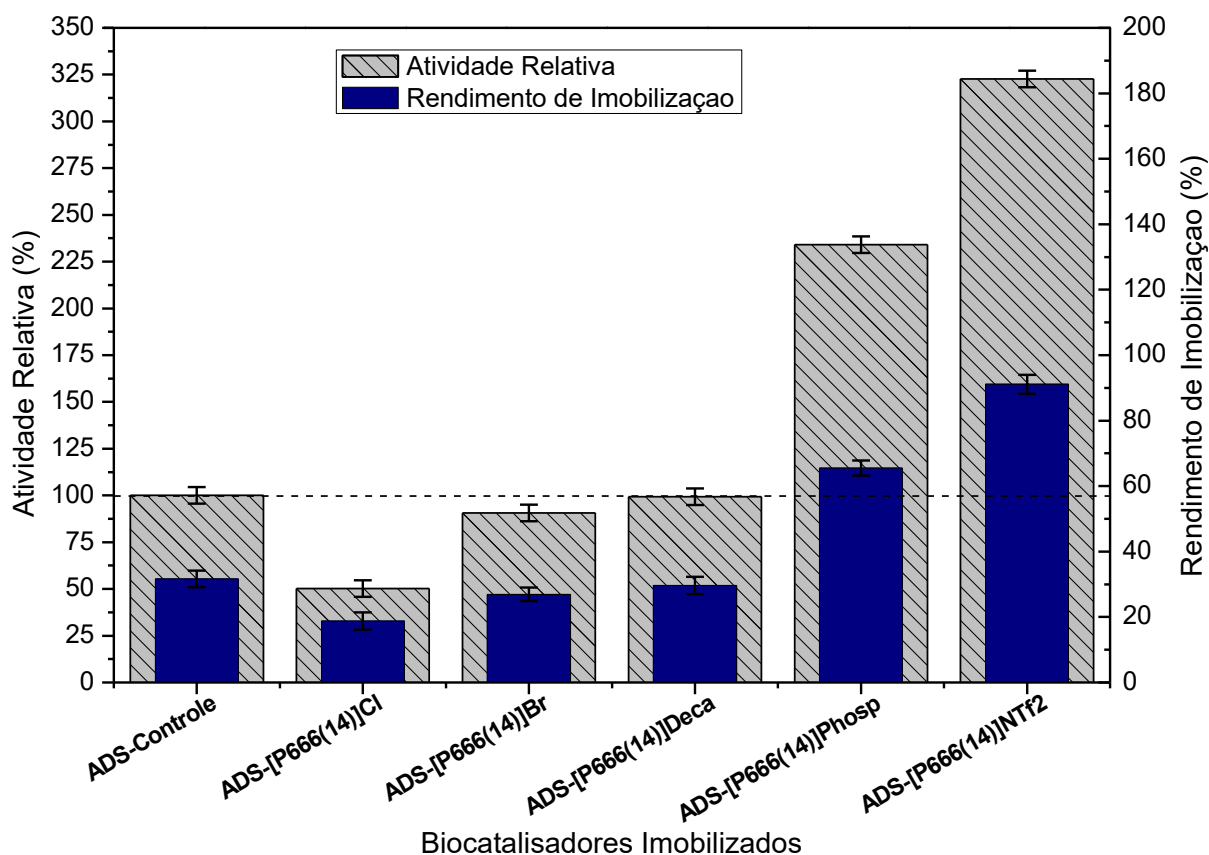
Estudos relatam que as características do cátion apresentam menor efeito dominante nas características da enzima quando comparadas com as propriedades do ânion, uma justificativa para isso é o fato de os ânions são mais fortemente hidratados que os cátions (NORDWALD e KAAR, 2013; GAO *et al.*, 2015). Assim, provavelmente a natureza do ânion  $[Cl]^-$  foi a maior responsável pela diminuição da atividade catalítica da lipase, já que o cloreto tem forte capacidade de formar ligações de hidrogênio e interagir fortemente com a enzima, alterando a sua estrutura original (KLAHN *et al.*, 2011; CLAUDIO *et al.*, 2014; KUMAR e VENKATESU, 2014).



**Figura 18:** Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica controle na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo ânion [Cl]<sup>-</sup> com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ([P<sub>444</sub>]<sup>+</sup>, [P<sub>444(14)</sub>]<sup>+</sup> e [P<sub>666(14)</sub>]<sup>+</sup>).

### 5.3.2. Efeito do ânion na imobilização por adsorção física

Para a avaliação do efeito do ânion no processo de imobilização foram adicionados líquidos iônicos à base de fosfônio com mesmo cátion [P<sub>666(14)</sub>]<sup>+</sup> e diferentes ânions ([Cl]<sup>-</sup>, [Br]<sup>-</sup>, [Deca]<sup>-</sup>, [Phosp]<sup>-</sup> e [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup>). A Figura 19 mostra que com a adição destes LIFs sintetizados com diferentes tipos de ânions houve tanto efeito negativo quanto positivo. Obteve-se bons resultados a respeito da atividade relativa e rendimento de imobilização para a lipase imobilizada na presença de LIFs com ânions de natureza hidrofóbica ([P<sub>666(14)</sub>]Phosp, [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>). Enquanto que a presença de LIFs com ânions de natureza hidrofílica [P<sub>666(14)</sub>]Cl, [P<sub>666(14)</sub>]Deca e [P<sub>666(14)</sub>]Br) durante o processo de imobilização promoveu efeito negativo para o biocatalisador.



**Figura 19:** Atividade relativa e rendimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica controle na presença de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo cátion  $[P_{666(14)}]^+$  com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ).

Segundo NAUSHAD *et al.* (2012), os ânions podem formar ligações de hidrogênio e, a depender das suas propriedades, interagir fortemente com a enzima, promovendo a sua alteração conformacional e influenciando diretamente na atividade e estabilidade. Os dados obtidos indicam que o biocatalisador imobilizado na presença do LIF  $[P_{666(14)}]NTf_2$  foi o mais eficaz, com valor de rendimento de imobilização de quase o triplo ( $ADS-[P_{666(14)}]NTf_2 = 91,09\%$ ) quando comparado ao controle ( $ADS-Control = 30,16\%$ ). Sugere-se que a ótima recuperação da atividade da lipase imobilizada na presença deste líquido iônico esteja relacionada com a hidrofobicidade do ânion selecionado.

Zarcula *et al.* (2010), estudaram a imobilização da lipase *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) em matrizes sol-gel híbridos utilizando líquidos iônicos à base de imidazólios com diferentes hidrofobicidades como aditivos e compararam com solventes orgânicos comuns. Os resultados indicaram que a presença dos grupos hidrofóbicos durante a imobilização converge para o microambiente ótima para a atividade da enzima. A presença de LIs mais hidrofóbicos nos meios reacionais conduziu a maiores eficiências catalíticas que com a presença de solventes orgânicos comuns.

Em um outro estudo posterior, Cabrera-Padilla *et al.* (2015), utilizaram líquidos iônicos à base de imidazólios de natureza hidrofóbica e hidrofílica como aditivos durante a imobilização por adsorção física da lipase de *Bacillus* sp. (ITP-001) em suporte de PHBV, a fim de avaliar a influência do núcleo catiônico, do comprimento da cadeia de catiônica e dos ânions no processo de imobilização. Os resultados indicaram que o biocatalisador mais eficiente foi aquele imobilizado na presença do líquido iônico mais hidrofóbico [C<sub>4</sub>min]NTf<sub>2</sub>, com aumento duas vezes maior na recuperação da atividade enzimática em comparação ao controle.

A partir da discussão dos dados a respeito da atividade relativa e do rendimento de imobilização, escolheu-se os biocatalisadores imobilizados (ADS-Controle e ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) para realizar as caracterizações físico-químicas e morfológicas.

### 5.3.3. Caracterização morfológica

A Tabela 8 resume parâmetros de textura das amostras ADS-Controle e ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, tais como a área superficial, volume de poros e diâmetro do poro. De acordo com os dados expostos e em comparação com a amostra ADS-Controle, é possível verificar uma notável diminuição da área superficial para o biocatalisador imobilizado na presença do LIF (ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>). Estes resultados estão em concordância com a literatura, que indica que essa redução é consequência do número maior de moléculas de enzimas confinadas no interior do suporte, e mostra a maior eficiência na imobilização da LBC na presença de líquidos iônicos (JIANG *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010; ZOU *et al.*, 2010).

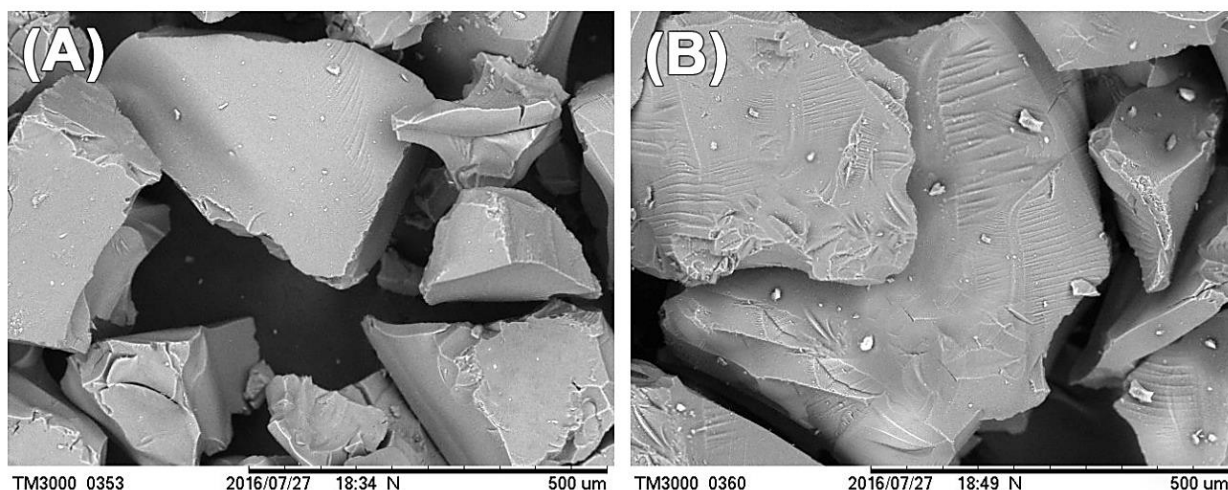
**Tabela 8:** Área superficial, volume de poros e diâmetro de poros dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física (ADS-Controle e ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>).

| Amostras                                    | Área Superficial (m <sup>2</sup> /g) | Volume dos Poros (cm <sup>3</sup> /g) | Diâmetro dos Poros (nm) |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| ADS-Controle                                | 701,2 ± 4,61                         | 0,91 ± 0,06                           | 1,82 ± 0,18             |
| ADS-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> | 359,90 ± 2,06                        | 1,35 ± 0,10                           | 3,68 ± 0,29             |

A Figura 20 exibe as micrografias dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física na ausência (ADS-Controle) e na presença de líquido iônico (ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>). A partir das imagens pode ser observado que a morfologia da superfície da sílica da amostra ADS-



[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> (Figura 20B) possui maior número de imperfeições e apresenta um número maior de partículas distribuídas de forma aleatória no material, que possivelmente seja a lipase, quando comparada com a superfície da amostra ADS-Controle (Figura 20A). Certamente, a presença do líquido iônico hidrofóbico influenciou de maneira positiva na imobilização da enzima.



**Figura 20:** Microscopia eletrônica de varredura para: (A) ADS-Controle (x200), (B) ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> (x200).

#### 5.3.4. Caracterização físico-química

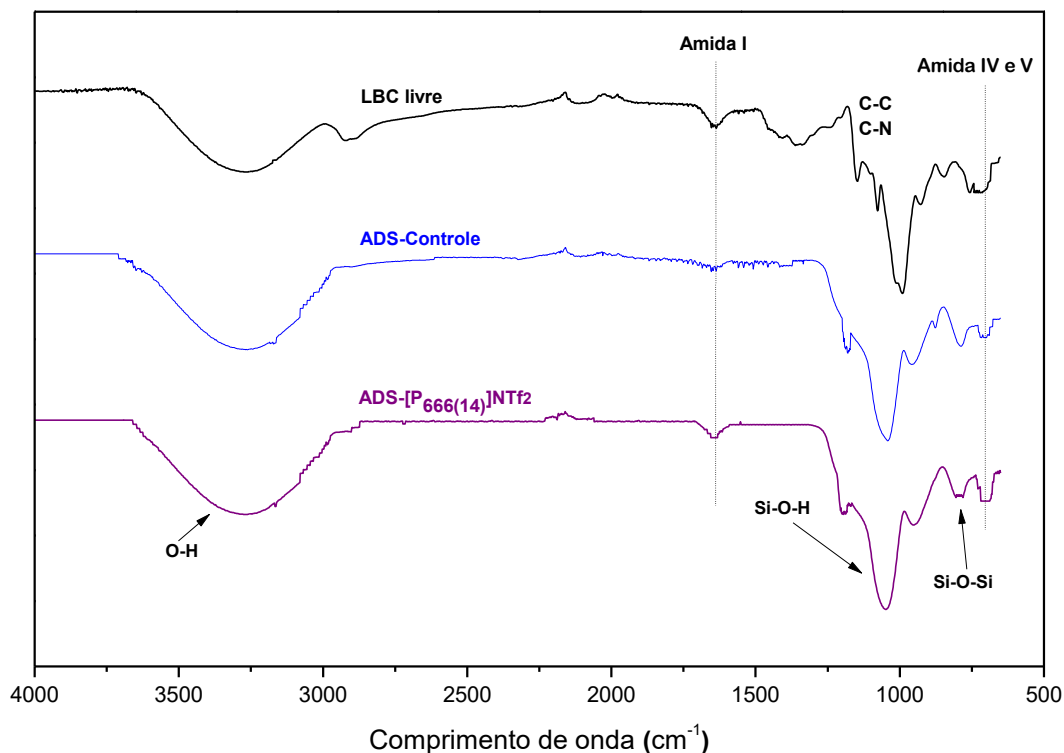
As perdas de massa de amostras da lipase *Burkholderia cepacia* e dos biocatalisadores imobilizados (ADS-Controle e ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) foram determinadas por análise termogravimétrica. Os dados de perdas de massa estão descritos na Tabela 9 e foram obtidos depois de aquecer as amostras em três diferentes regiões de temperatura: Região I (entre 25 e 200°C), Região II (entre 200 e 400°C) e Região III (entre 400 e 1000°C).

**Tabela 9:** Perda de massa parcial e total dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física (ADS-Controle e ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>).

| Amostras                                    | Região I<br>(25 – 200°C) | Região II<br>(200 – 400°C) | Região III<br>(400 – 1000°C) | Perda total de<br>massa (%) |
|---|--------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| ADS-Controle                                | 18,25 ± 1,34             | 4,42 ± 0,21                | 1,65 ± 0,07                  | 24,32 ± 1,62                |
| ADS-[P <sub>666(14)</sub> ]NTf <sub>2</sub> | 18,42 ± 1,41             | 4,70 ± 0,41                | 2,13 ± 0,12                  | 25,25 ± 1,94                |

Na Região I, os termogramas indicaram perdas de massa de 18,25 e 18,42% para ADS-Controle e ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, respectivamente. Associadas principalmente com a extração da água presente na superfície do biocatalisador imobilizado, além da decomposição de grupos amino, geralmente de grupos orgânicos. Sugere-se que a perda de massa associada a esta região foi um pouco maior para o biocatalisador imobilizado na presença do LIF [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> devido à característica higroscópica dos líquidos iônicos, ou seja, a sua alta capacidade de absorver água (KRANNICH *et al.*, 2016). Na Região II, foram observadas menores perdas de massa em comparação a Região I, 4,42% para ADS-Controle e 4,70% para ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, relacionadas à decomposição térmica de grupos silanol da sílica e alguma perda de constituintes orgânicos (C, H, O e N) sob a forma de voláteis presentes ou formados no início da decomposição orgânica, incluindo a lipase (KAROUT e PIERRE, 2007). Para a Região III, a perda de massa está associada com a decomposição dos líquidos iônicos, o que indica que algum líquido iônico residual estava presente no biocatalisador imobilizado, a água residual nos interstícios das amostras, as reações de desidroxilação finais e carbonização definitiva de compostos orgânicos, abrangendo a lipase. Também nesta região, mais precisamente na gama acima de 750°C, a degradação completa do material é alcançada (SOARES *et al.*, 2004).

As amostras da lipase *Burkholderia cepacia* imobilizadas em sílica na ausência (ADS-Controle) ou na presença do LIF (ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) também foram caracterizadas por FTIR (Figura 21). Ambos os materiais analisados apresentaram espectros com comprimentos de onda característicos de constituintes presentes na sílica produzida pela técnica sol-gel, com bandas entre 800 e 1000 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si), entre 900 e 1100 cm<sup>-1</sup> (Si-OH) e entre 3400 e 3500 cm<sup>-1</sup> (grupos -OH) (SOARES *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2013; ANUAR *et al.*, 2013). A partir dos espectros também foi possível confirmar a presença da lipase imobilizada, por meio de bandas características de proteínas em três diferentes regiões de comprimento de onda: 695 cm<sup>-1</sup> (grupos IV e V), 1000–1100 cm<sup>-1</sup> (amida I) e entre 1000–1100 cm<sup>-1</sup> (C-C e C-N). Estas últimas bandas são mais evidentes na amostra ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>, provavelmente devido ao efeito positivo do líquido iônico à base de fosfônio utilizado como aditivo (PORTACCIO *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012).



**Figura 21:** Espectros de FTIR da LBC livre, dos biocatalisadores imobilizados por adsorção física (ADS-Control e ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>).

#### 5.4. COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS À BASE DE FOSFÔNIO NAS DIFERENTES ETAPAS

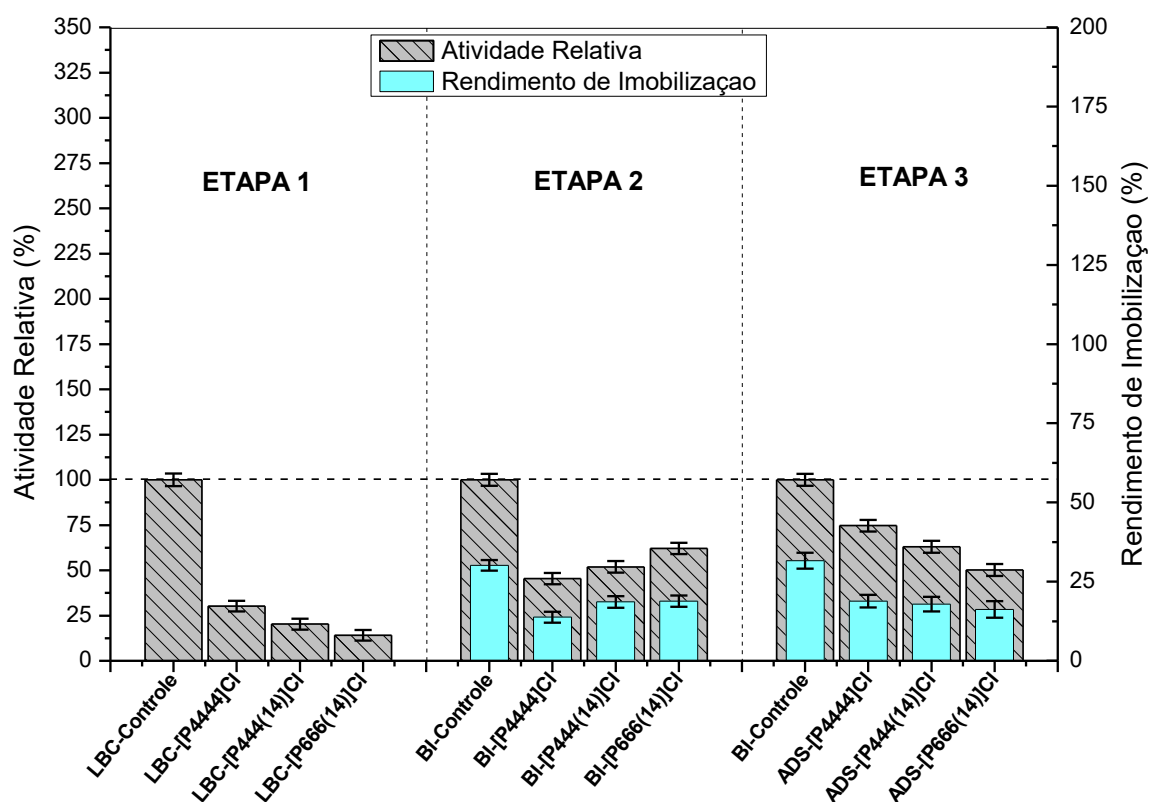
Nesta seção é comparada a influência da aplicação de líquidos iônicos à base de fosfônio nas três diferentes etapas: na atividade da lipase *Burkholderia cepacia* livre (Etapa 1); na modificação superficial da sílica (Etapa 2); e na atividade da LBC imobilizada por adsorção física em sílica (Etapa 3). A fim de facilitar a compreensão, inicialmente são analisados os efeitos dos LIFs com distintos comprimentos de cadeia catiônica ([P<sub>4444</sub>]Cl, [P<sub>444(14)</sub>]Cl e [P<sub>666(14)</sub>]Cl) e, posteriormente, verifica-se a influência de líquidos iônicos à base de fosfônio com diferentes ânions ([P<sub>666(14)</sub>]Cl, [P<sub>666(14)</sub>]Br, [P<sub>666(14)</sub>]Deca, [P<sub>666(14)</sub>]Phosp e [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>).

##### 5.4.1. Efeitos do comprimento da cadeia catiônica nas diferentes etapas

A partir da Figura 22, pode-se verificar as influências do comprimento da cadeia catiônica dos líquidos iônicos à base de fosfônio ([P<sub>4444</sub>]Cl, [P<sub>444(14)</sub>]Cl, [P<sub>666(14)</sub>]Cl) na atividade relativa

(Etapa 1, Etapa 2 e Etapa 3) e no rendimento de imobilização (Etapa 2 e Etapa 3) da lipase *Burkholderia cepacia* livre e imobilizada por adsorção física.

Para todas as etapas, notou-se a redução da atividade relativa (Etapas 1, 2 e 3) e do rendimento de imobilização (Etapas 2 e 3). Entretanto, o LIF de maior comprimento de cadeia catiônica ( $[P_{666(14)}]^+$ ) promoveu maiores efeitos negativos nas etapas 1 e 3, com redução da atividade relativa de cerca de 86% (LBC- $[P_{666(14)}]Cl$ ) e 50% (ADS- $[P_{666(14)}]Cl$ ), respectivamente. A razão para isto é o fato de que, somente nestas duas etapas, os líquidos iônicos à base de fosfônio interagem diretamente com a lipase, podendo desestabilizar a sua estrutura e inativá-la (ATTRI *et al.*, 2011). Em contrapartida, quando os LIFs estiveram em contato apenas com os constituintes da sílica, observou-se que a seleção do cátion de menor comprimento foi o que causou diminuição mais acentuada para a atividade relativa (54%) e rendimento de imobilização (16%). Líquidos iônicos sintetizados com cátions de cadeias curtas possuem maior natureza hidrofílica e, quando aplicados na modificação superficial da sílica, provocam maior limitação difusional devido à diminuição do volume e tamanho dos poros do suporte modificado (QUIRÓS *et al.*, 2011).

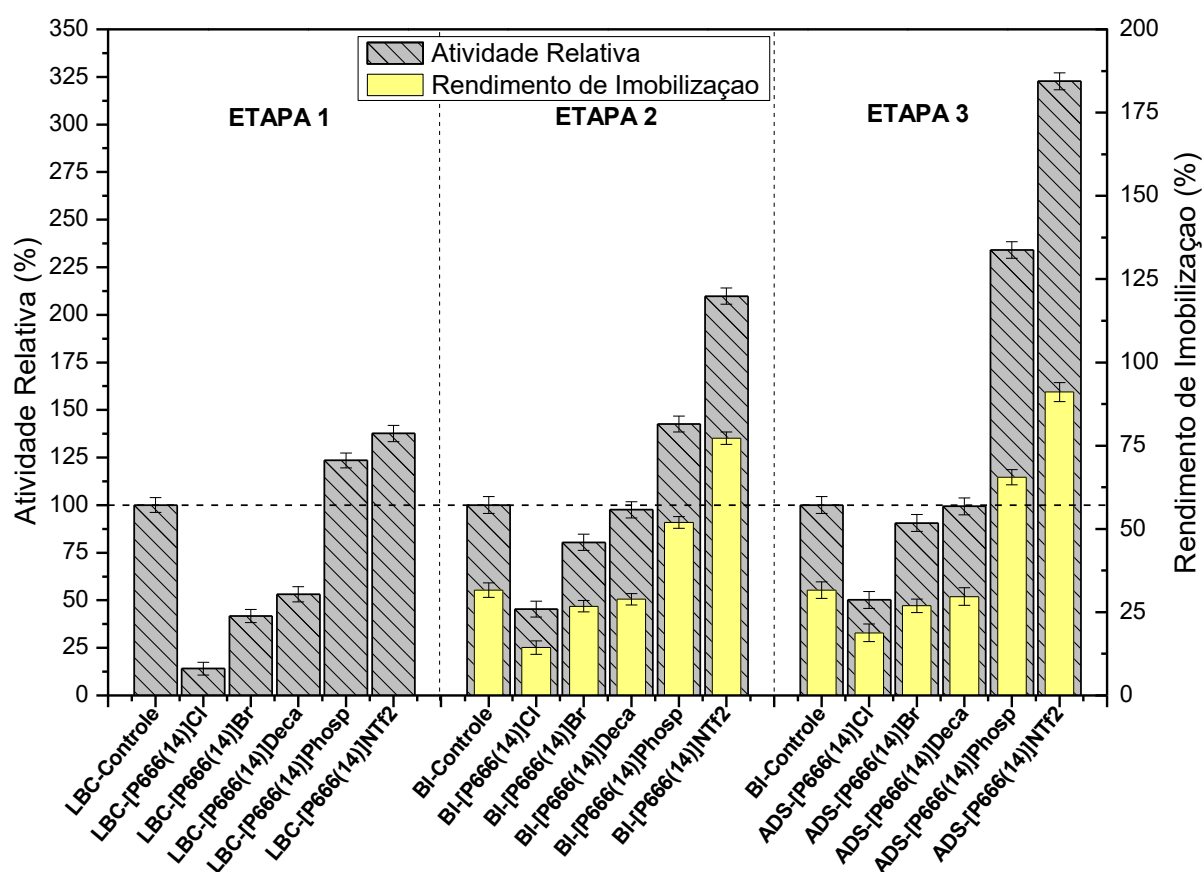


**Figura 22:** Efeitos de LIFs de mesmo ânion  $[Cl]^-$  com diferentes comprimentos de cadeia catiônica ( $[P_{444}]^+$ ,  $[P_{444(14)}]^+$  e  $[P_{666(14)}]^+$ ) na atividade relativa (Etapa 1, Etapa 2 e Etapa 3) e rendimento de imobilização (Etapa 2 e Etapa 3) da LBC na hidrólise de azeite de oliva. Efeitos de LIFs em LBC livre (Etapa 1), na modificação superficial de sílica (Etapa 2), e adicionados durante a imobilização da LBC por adsorção física (Etapa 3).

### 5.4.2. Efeito do ânion nas diferentes etapas

Nesta seção, é discutida a influência de líquidos iônicos à base de fosfônio de mesmo cátion  $[P_{666(14)}]^+$  e diferentes ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ) na atividade relativa (Etapa 1, Etapa 2 e Etapa 3) e no rendimento de imobilização (Etapa 2 e Etapa 3) da lipase *Burkholderia cepacia* livre e imobilizada por adsorção física.

A Figura 23 mostra que, a de acordo com o LIF selecionado, houve diferentes tendências de comportamento da atividade relativa (Etapas 1, 2 e 3) e do rendimento de imobilização (Etapas 2 e 3) da LBC. Com redução da atividade relativa e do rendimento de imobilização quando se aplicou LIFs com ânions de natureza mais hidrofílica, seguindo a tendência:  $[Cl]^- > [Br]^- > [Deca]^-$ .



**Figura 23:** Efeitos de LIFs de mesmo cátion  $[P_{666(14)}]^+$  com diferentes ânions ( $[Cl]^-$ ,  $[Br]^-$ ,  $[Deca]^-$ ,  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$ ) na atividade relativa (Etapa 1, Etapa 2 e Etapa 3) e rendimento de imobilização (Etapa 2 e Etapa 3) da LBC na hidrólise de azeite de oliva. Efeitos de LIFs em LBC livre (Etapa 1), na modificação superficial de sílica (Etapa 2), e adicionados durante a imobilização da LBC por adsorção física (Etapa 3).

Quando se selecionou LIFs  $[Phosp]^-$  e  $[NTf_2]^-$  notou-se a hiperativação interfacial da enzima, com aumento da atividade relativa (Etapas 1, 2 e 3) e do rendimento de imobilização (Etapas 2 e 3). Segundo Neves *et al.* (2011), dentre os LIFs aplicados no presente estudo, o

líquido iônico [P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> é o LI mais hidrofóbico estudado. Este fato pode justificar o acentuado efeito positivo para a atividade da LBC na presença deste líquido iônico, uma vez que estudos afirmam que LIs mais hidrofóbicos tendem a manter a estrutura proteica e preservar a camada de hidratação em torno da enzima e, ao mesmo tempo, facilitar o acesso do substrato ao sítio catalítico, favorecendo assim a hiperativação interfacial da enzima (COLLINS *et al.*, 2007; ZHAO, 2016).

Os efeitos positivos foram mais significativos quando se adicionou o LIF mais hidrofóbico ([P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) durante o processo de imobilização por adsorção física, com aumento de cerca de 223% na atividade relativa e de cerca de 60% no rendimento de imobilização (Etapa 3). Estes resultados estão de acordo com o recente estudo de Zhao (2016), que evidenciou que os líquidos iônicos mais hidrofóbicos favorecem a manutenção da estrutura nativa das proteínas e preservam a sua camada de hidratação, o que facilita o acesso do substrato ao sítio catalítico.

### 6. CONCLUSÃO

Uma vez que não há informação na literatura a respeito dos efeitos de líquidos iônicos à base de fosfônio sobre a atividade da lipase *Burkholderia cepacia* livre, bem como a sua aplicação na modificação superficial da sílica e durante o processo de imobilização por adsorção física da LBC, este trabalho mostrou, pela primeira vez, que a atividade catalítica da LBC livre é ligeiramente dependente das propriedades dos LIFs presentes no meio da reação de hidrólise de azeite de oliva. Uma vez que os resultados demonstram que a presença de LIFs hidrofílicos promove efeito negativo sobre a atividade da enzima e, a presença de LIFs hidrofóbicos favorece de forma positiva o desempenho catalítico da LBC. Para a aplicação de LIFs na modificação da superfície da sílica produzida pela técnica sol-gel, verificou-se que a presença de LIFs hidrofóbicos (Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]Phosp e Sílica-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) promoveu melhorias nas características morfológicas e físico-químicas dos suportes modificados, o que resultou em uma eficiência catalítica mais elevada para o biocatalisador imobilizado em sílica modificada com LIF mais hidrofóbico (BI-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>), que apresentou rendimento de imobilização igual a 77,26%. No que diz respeito a adição de LIFs durante o processo de imobilização por adsorção física da LBC em sílica controle, notou-se que o LIF mais hidrofóbico ([P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub>) promoveu aumento de mais de 3 vezes no rendimento de imobilização do biocatalisador imobilizado ADS-[P<sub>666(14)</sub>]NTf<sub>2</sub> (91,09%), em comparação com ADS-Controle (30,16%), o que foi comprovado a partir das caracterizações morfológicas e físico-químicas dos biocatalisadores imobilizados. O comportamento relatado aqui mostra que o efeito positivo se torna mais significativo quando o LIF com caráter mais hidrofóbico é adicionado durante o processo de imobilização. Assim, a utilização de líquidos iônicos à base de fosfônio hidrofóbicos pode ser a base para o desenvolvimento de métodos mais eficientes de imobilização de enzimas.

### 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade e complementar os estudos da aplicação de líquidos iônicos à base de fosfônio na biocatálise, sugere-se:

- Verificar a influência de aplicação de líquidos iônicos à base de fosfônio em diferentes concentrações na lipase *Burkholderia cepacia* livre, na modificação superficial da sílica e durante o processo de imobilização;
- Investigar, a nível molecular, os efeitos de líquidos iônicos à base de fosfônio na atividade e estabilidade da lipase *Burkholderia cepacia* livre;
- Testar outros procedimentos de imobilização para a lipase *Burkholderia cepacia*, tais como ligação covalente e encapsulamento;
- Analisar a capacidade de adsorção e o efeito difusional dos biocatalisadores imobilizados na presença dos líquidos iônicos à base de fosfônio;
- Aplicar os biocatalisadores imobilizados na síntese de ésteres de interesse industrial;
- Realizar as reações em meios não convencionais como, por exemplo, micro-ondas;
- Estudar a viabilidade econômica da metodologia desenvolvida em questão.



### 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAHAZI, E.; BOROS, Z.; POPPE, L. Additives enhancing the catalytic properties of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on mixed-function-grafted mesoporous silica gel. *Molecules*, 19, p. 9818-9837, 2014.
- ADAM, F.; APPATURIA, J. N.; ANWAR, I. The utilization of rice husk silica as a catalyst: Review and recent progress, *Catalysis Today*, 190, p. 2-14, 2012.
- ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S. S.; YILDIRIM, D.; ALAGÖZ, D. Covalent immobilization of catalase onto spacer-arm attached modified florisil: Characterization and application to batch and plug-flow type reactor systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 49, p. 547-554, 2011.
- 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*, 299, p. 42-50, 2010.
- ALVAREZ-GUERRA, E.; IRABIEN, A.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P. Ionic liquid recovery alternatives in ionic liquid-based three-phase partitioning (ILTPP). *Aiche Journal*, 60, p. 577-3586, 2014.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39, p. 301-312, 2010.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, HEIZIR F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 84, p. 183-188, 2012.
- 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. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 92, p. 62-70, 2013.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC Trends Analytical Chemistry*, 71, p. 2-8, 2015.
- ATEFI, F.; GARCIA, M. T.; SINGER, R. D.; SCAMMELLS, P. J. Phosphonium ionic liquids: design, synthesis and evaluation of biodegradability. *Green Chemistry*, 11, p. 1595-1604, 2009.
- ATTRI, P.; VENKATESU, P.; KUMAR, A. Activity and stability of  $\alpha$ -*Quimotripsina* in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. *Physiscal Chemistry Chemical Physics*, 13, p. 2788-2796, 2011.
- BALL, P. Water as a biomolecule. *Chemical Physicis and Physical Chemistry*, 9, p. 2677-2685, 2008.

- BARANYAI, K. J.; DEACON, G. B.; MACFARLANE, D. R.; PRINGLE, J. M.; SCOTT, J. L. Thermal degradation of ionic liquids at elevated temperatures. *Australian Journal of Chemistry*, 57, p. 141-147, 2004.
- BARBE, S.; LAFAQUIERE, V.; GUIEYSSE, D.; MONSAN, P.; REMAUDSIM M. E.; ANDRE, I. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins*, 77, p. 509-523, 2009.
- BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; MELO, C. M.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001. *Química Nova*, 3, p. 1173-1179, 2012.
- BARON, A. M.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. *Fuel*, 458, p. 117-123, 2014.
- BAYNE, L.; ULIJN, R. V.; HALLING, P. J. Effect of pore size on the performance of immobilised enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 9000-9010, 2013.
- BELLE, V.; FOURNEL, A.; WOULDSTRA, M.; RANALDI, S.; PRIERI, F.; THOME, V.; CURRAULT, J.; VERGER, R.; GUIGLIARELLI, B.; CARRIERE, F. Probing the opening of the pancreatic lipase lid using site-directed spin labeling and EPR spectroscopy. *Biochemical*, 46, p. 205-2214, 2007
- BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. *Química Nova*, 32, 1926-1933, 2009.
- BERNAL, C.; ILLANES, A.; WILSON, L. Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: application to lactulose palmitate synthesis. *Langmuir*, 176, p. 3557-3564, 2014.
- BOLIVAR, J. M.; EISL, I.; NIDETZKY, B. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. *Catalysis Today*, 76, p. 115-129, 2016.
- BON, E. P. S.; FERRARA M. A.; CORVO M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. *Inteciência*, 1, 2008.
- BRADARIC, C. J.; DOWNARD, A.; KENNEDY, C.; ROBERTSON, A. J.; ZHOU, Y. Industrial preparation of phosphonium ionic liquids. *Green Chemistry*, 82, p. 94-101, 2003.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, p. 309-319, 1938.
- BUBALO, M. C.; VIDOVIC, S.; REDOVNIKOVIC, I. R.; JOKIC, S. Green solvents for green Technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 48, p. 311-318, 2015.
- CABRERA-PADILLA, R. Y.; LISBOA, M. C.; PEREIRA, M. M.; FIGUEIREDO, R. T.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A. S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto an eco-friendly support in the presence of ionic liquid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, p. 805-814, 2015.

- CABRERA-PADILLA, R. Y.; MELO, E. B.; 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. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90, p. 1308-1316, 2015.
- CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C.; FATTOR, D.; SPIZZO, P.; GARDOSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society Reviews*, 42, 6262-6269, 2013.
- CANTONE, S.; HANEFELD, U.; BASSO, A. Biocatalysis in non-conventional media ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. *Green Chemistry*, 9, p. 954-971, 2007.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*, 38, p. 399-409, 2015.
- CARVALHO, N. B.; SILVA, M. A. O.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, 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. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, p. 130-135, 2014.
- CEVASCO, G.; CHIAPPE, C. Are ionic liquids a proper solution to current environmental challenges. *Green Chemistry*, 16, p. 2375-2385, 2014.
- CHEN, X.; FLORES, S. C.; LIM, S-M.; ZHANG, Y.; YANG, T.; KHERB, J. Specific anion effects on water structure adjacent to protein monolayers. *Langmuir*, 26, p. 16447-16454, 2010.
- CLAUDIO, A. F. M.; MARQUES, C. F. C.; BOAL-PALHEIROS, I.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Development of back-extraction and recyclability routes for ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Green Chemistry*, 16, p. 259-268, 2014.
- COLLINS, K. D.; NEILSON, G. W.; ENDERBY, J. E. Ions in water: characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophysical Chemistry*, 128, p. 95-104, 2007.
- COWAN, M. G.; MASUDA, M.; MCDANEL, W. M.; KOHNO, Y.; GIN, D. L.; NOBLE, R. D. Phosphonium-based poly(ionic liquid) membranes: the effect of cation alkyl chain length on light gas separation properties and ionic conductivity. *Journal Membrane*, 92, p. 217-224, 2016.
- CRISTÓVÃO, R. O.; TAVARES, A.; BRIGIDA, A.; LOUREIRO, J.; RUI, A. R. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, p. 6-12, 2011.
- CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; SILVA, A. A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMAS, A. B. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica* – effect of the support nature on catalytic properties, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, p. 59-67, 2014.

- DE CASTRO, H. F.; SIMÕES A S.; MORI R. Y.; FARIA R. Desempenho da matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. *Química Nova*, 27, p. 146-152, 2004.
- DEETLEFS, M.; SEDDON, K. R. Assessing the greenness of some typical laboratory ionic liquid preparations. *Green Chemistry*, 12, p. 17-30, 2010.
- DEL SESTO, R. E.; CORLEY, C.; ROBERTSON, A.; WILKES, J. S. Tetraalkylphosphonium-based ionic liquids. *Journal Organomet Chemical*, 690, p. 2536-2542, 2005.
- DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6437-6474, 2013.
- EARLE, M. J.; ESPERANCA, J.; GILEA, M. A.; LOPES, J. N. C.; REBELO, L. P. N.; MAGEE, J. W.; SEDDON, K. R.; WIDEGREN, J. A. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature*, 439, p. 831-834, 2006.
- EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, p. 2065-2082, 2015.
- FERNÁNDEZ, O.; DÍAZ, I.; TORRES, C.; MONTSERRAT, T.; TEJEDOR, V.; BLANCO, R. Hybrid composites octyl-silica-methacrylate agglomerates as enzyme supports. *Applied Catalysis A: General*, 450, p. 204-210, 2013.
- FINDRIK, Z.; MEGYERI, G.; GUBICZA, L.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; NEMESTÓTHY, N.; SUDAR, M. Lipase catalyzed synthesis of glucose palmitate in ionic liquid. *Journal of Cleaner Production*, 112, p. 1106-1111, 2016.
- FRASER, K. J.; MACFARLANEA, D. R. Phosphonium-Based Ionic Liquids: An Overview. *Australian Journal of Chemistry*, 62, p. 309-321, 2009.
- FREIRE, M. G.; CLAUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M., CANONGIA-LOPES, J. N.; REBELO, L. P. N. Aqueous Biphasic Systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chemical Society Reviews*, 41, 4966-4995, 2012.
- FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO<sub>2</sub>-PVA composite. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65, p. 87-96, 2010.
- FUKAYA, Y.; HIROYUKI OHNO, H. Hydrophobic and polar ionic liquids. *Physiscal Chemistry Chemical Physics*, 15, p. 4066-4072, 2013.
- GAO, W.; ZHANG, F.; ZHANG, G.; ZHOU, C. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. *Biochemical Engineering Journal*, 99, p. 67-84, 2015.
- GATHERGOOD, N.; GARCIA, M. T.; SCAMMELLS, P. J. Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation. *Green Chemistry*, 6, p. 166-175, 2004.

- GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, M.N.; EL-AZZOUNY, A.; EL-BEHAIRY, M.F. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic acidic drugs in non-standard organic solvents: Direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. *Journal of Chromatography A*, 1217, p. 1063-1074, 2010.
- GIBB, C. L. D.; GIBB, B. C. Anion binding to hydrophobic concavity is central to the salting-in effects of Hofmeister chaotropes. *Journal of the American Chemical Society*, 133, p. 7344-7347, 2011.
- GOG, A.; ROMAN, M.; TOSA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D.; Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy*, 39, p. 10-16, 2012.
- GRAY, C. J.; WEISSENBORN, M. J.; EYERS, C. E.; PLITSCH, S. L. Enzymatic reactions on immobilised substrates. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6378-6405, 2013.
- GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17, p. 68-74, 2011.
- HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, R. Enzyme immobilisation: fundamentals and application. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6211-6219, 2013.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38, p. 453-468, 2009.
- HARA, P.; MIKKOLA, J-P.; MURZINB, D. Y.; KANERVA, L. T. Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, p. 129-134, 2010.
- HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *Materials Chemistry*, 20, p. 844-857, 2010.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, p. 235-251, 2006.
- HECKENBACH, M. E.; ROMERO, F. N.; GREEN, M. D.; HALDEN, R. U. Meta-analysis of ionic liquid literature and toxicology. *Chemosphere*, 150, p. 266-274, 2016.
- HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, p. 107-122, 2011.
- HERRIOTT, A. W.; PICKER, D. Phase transfer catalysis. Evaluation of catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 97, p. 2345-2351, 1975.
- HOFMEISTER, F. M.; YALON, M.; IIDA, S.; STACHOLY, J.; GOLDBERG, E. P. Evaluation of the Tissue-Protective Properties of Hydrophilic Surface Modified Intraocular-Lens Implants. *Progress in Biomedical Polymers*, 196, p. 22-29, 1988.

- 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*, 47, p. 2291-2299, 2012.
- HU, Z.; HU, Y.; XIA, J.; TANG, S.; LIU, W.; HUANG, H. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. *Biochemical Engineering Journal*, 53, p. 150-158, 2010.
- HUSSEY, C.L. Room temperature haloaluminate ionic liquids: Novel solvents for transition metal solution chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 60, p. 1763-1772, 1988.
- HWANG, E. T.; GU, M. B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Engineering in Life Sciences*, 12, p. 49-61, 2013.
- ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 543-549, 2009.
- JALADI, H.; KATIYAR, A.; THIEL, S. W.; GULIANTS, V. V.; PINTO, N. G. Effect of pore diffusional resistance on biocatalytic activity of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SBA-15 hosts. *Chemical Engineering Science*, 64, p. 1474-1479, 2009.
- JEEVAPANI, J. H.; KASHYAP, H. K.; MARGULIS, C. J. Communication: Anomalous temperature dependence of the intermediate range order in phosphonium ionic liquids. *Journal Chemical Physics*, 140, p. 334-339, 2014.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20, p. 801-809, 2014.
- JIANG, Y.; GUO, C.; XIA, H.; MAHMOOD, I.; LIU, C.; LIU, H. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58, p. 103-109, 2009.
- JUN, C.; JEON, B. W.; JOO, G. C.; LE, Q. A. T.; GU, S.; BYUN, S.; CHO, D. H.; KIM, D.; SANG, B.; KIM, Y. H. Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. *Process Biochemistry*, 48, p. 1181-1187, 2013.
- KAROUT, A.; PIERRE, A. C. Silica xerogels and aerogels synthesized with ionic liquids. *Journal Non-Crystal Solids*, 353, p. 2900-2909, 2007.
- KATIYAR, M.; ALI, A. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on MCM-41 for the transesterification of cotton seed oil. *Journal Oleo Science*, 61, p. 469-475, 2012.
- KATO, R.; GMEHLING, J. Activity coefficients at infinite dilution of various solutes in the ionic liquids. *Fluid Phase Equilibria*, 226, p. 37-44, 2004.
- KESTENBACH, H.; NOCITE, N. C. P. S.; GREGÓRIO, R.; LOOS, J.; PETERMANN, J. Resolução lamelar num novo microscópio eletrônico de varredura. *Polímeros*, 7, 1997.

- KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, 5, p. 173-185, 1997.
- KLAHN, M.; LIM, G. S.; SEDURAMANA, A.; PING WU, P. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. *Physysical Chemistry Chemical Physics*, 13, p. 1649-1662, 2011.
- KRANNICH, M.; HEYM, F.; JESS, A. Characterization of Six Hygroscopic Ionic Liquids with Regard to Their Suitability for Gas Dehydration: Density, Viscosity, Thermal and Oxidative Stability, Vapor Pressure, Diffusion Coefficient, and Activity Coefficient of Water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 61, p. 1162-1176, 2016.
- KUMAR, A.; VENKATESU, P. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, p. 244-253, 2014.
- LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H. H.; A. A. MENDES. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, 84, p. 56-67, 2016.
- LEE, S. H.; DOAN, T. T. N.; HÁ, S.H.; KOO, Y. M. Influence of ionic liquids as additives on sol-gel immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45, p. 57-61, 2007.
- LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6236-6249, 2013.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. *Química Nova*, 22, p. 229-245, 1999.
- LIU, W.; CHEN, B.; WANG, F.; TAN, T.; DENG, L. Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters and properties characterization. *Process Biochemistry*, 46, p. 193-198, 2011.
- LUNGWITZ, R.; SPANGE, S. A hydrogen bond accepting (HBA) scale for anions, including room temperature ionic liquids. *New Journal Chemistry*, 32, p. 392-394, 2008.
- LUNGWITZ, R.; STREHMEL, V.; SPANGE, S. The dipolarity/polarisability of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids as function of anion structure and the alkyl chain length. *New Journal Chemistry*, 34, p. 1135-1140, 2010.
- MACFARLANE, D. R.; SEDDON, K. R. Ionic liquids progress on the fundamental issues. *Australian Journal of Chemistry*, 60, p. 3-5, 2007.
- MAHMOUD, M. E.; AL-BISHRI, H. M. Supported hydrophobic ionic liquid on nano-silica for adsorption of lead. *Chemistry Engineering Journal*, 166, p. 157-167, 2011.
- MANOEL, E. A.; DOS SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, p. 53-57, 2015.

- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, p. 1451-1463, 2007.
- MATSUBARA, Y.; KADOTANI, S.; NISHIHARA, T.; HIKINO, Y.; FUKAYA, Y.; OSHIKI NOKAMI, T.; ITOH, T. Phosphonium alkyl PEG sulfate ionic liquids as coating materials for activation of *Burkholderia cepacia* lipase. *Biotechnology Journal*, 345, p. 768-776, 2015.
- MEUNIER, S. M.; LEGGE, R. L. Evaluation of diatomaceous earth supported lipase sol gels as a medium for enzymatic transesterification of biodiesel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77, p. 92-87. 2012.
- MILETIC, N, NASTASOVIC A, LOOS K - Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*, 115, p. 126-135, 2012.
- MIRAU, P. A.; SERRES, J. L.; JACOBS, D.; GARRETT, P. H.; VAIA, R. A. Structure and dynamics of surfactant interfaces in organically modified clays. *Journal Chemical Physics B*, 112, p. 105-110, 2008.
- MONIRUZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 295-314, 2010.
- MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. Análise térmica de materiais. São Paulo: Editora, 2002.
- MOURA, C. V. R.; NUNES, A. S. L.; MOITA NETO, J. M.; NERES, H. L. S.; CARVALHO, L. M. G.; MOURA, E. M. Synthesis and characterization of polyesters from glycerol by-product of biodiesel production. *Journal of the Brazilian Society*, 23, p. 1226-1231, 2012.
- MUKHERJEE, I.; MYLONAKIS A.; GUO Y.; SAMUEL S.P.; LI S.; WEI R.Y.; KOJTARI A.; WEI Y. Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous silica nanospheres. *Microporous and Mesoporous Materials*, 122, p. 168-174, 2009.
- NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. *Biotechnology Letter*, 35, p. 479-490, 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*, 51, p. 555-560, 2012.
- NEVES, C. M.; CARVALHO, P. J.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. Thermophysical properties of pure and water-saturated tetradecyltrihexylphosphonium-based ionic liquids. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43, p. 948-957, 2011.



- NEWMAN, S. G.; JENSEN, K. F. The role of flow in green chemistry and engineering. *Green Chemistry*, 15, p. 1456-1472, 2013.
- NORDWALD, E. M.; KAAR, J. L. Stabilization of enzymes in ionic liquids via modification of enzyme charge. *Biotechnology and Bioengineering*, 123, p. 156-164, 2013.
- PAPADOPOULOU, A. A.; TZANI, A.; ALIVERTIS, D.; KATSOURA, M. H.; POLYDERA, A. C.; DETSI, A.; STAMATIS, H. Hydroxyl ammonium ionic liquids as media for biocatalytic oxidations. *Green Chemistry*, 456, p. 345-351, 2013.
- PAQUES, F. W.; MACEDO G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, 29, p. 93-99, 2006.
- PATEL, V.; NAMBIAR, S.; MADAMWAR, D. An extracellular solvent stable alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. DMVR46: partial purification, characterization and application in nonaqueous environment. *Process Biochemistry*, 49, p. 1673-1681, 2014.
- 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*, 57, p. 204-211, 2011.
- PRETTI, C.; CHIAPPE, C.; BALDETTI, I.; BRUNINI, S.; MONNI, G.; INTORRE, L. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, p. 1170-1176, 2009.
- QUIRÓS, M.; GARCÍA, A. B.; MONTES-MORÁN, M. A. Influence of the support surface properties on the protein loading and activity of lipase/mesoporous carbon biocatalysts. *Carbon*, 49, p. 406-415, 2011.
- RAMOS, E. Z.; JÚNIOR, R. H. M.; CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; FERNANDÉZ-LAFUENTEC, R.; HIRATA, D. B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 118, p. 43-51, 2015.
- RAMOS, M. A.; GIL, M. H.; SCHACT, E.; MATTHYS, G.; MONDELAERS, W. FIGUEIREDO, M. M. Physical and chemical characterisation of some silicas and sílica derivatives. *Powder Technology*, 99, p. 79-85, 1998.
- RANALDI, S.; BELLE, V.; WOULDSTRA, M.; RODRIGUEZ, J.; GUIGLIARELLI, B.; STURGIS, J.; CARRIERE, F.; FOURNEL, A. Lid opening and unfolding in human pancreatic lipase at low pH revealed by site-directed spin labeling EPR and FTIR spectroscopy (dagger). *Biochemistry*, 48, p. 630-638, 2009.
- RANKE, J.; MULLER, A.; BOTTIN-WEBER, U.; STOCK, F.; STOLTE, S.; ARNING, J.; STORMANN, R.; JASTORFF, B. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, p. 430-438, 2007.

- RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews*, 107, p. 2757-2785, 2007.
- REBELO, L. P.; CANONGIA, L. J. N.; ESPERANÇA, J.M.; FILIPE, E. On the critical temperature, normal boiling point, and vapor pressure of ionic liquids. *Journal Chemical Physics B*, 109, p. 6040-6043, 2005.
- REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, p. 527-534, 1996.
- REHMANN, L.; IVANOVA, E.; GUNARATNE, H. N.; SEDDON, K. R.; STEPHENS, G. Enhanced laccase stability through mediator partitioning into hydrophobic ionic liquids. *Green Chemistry*, 16, p. 1462-1469, 2014.
- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 148, p. 237-250, 2009.
- REMBERT, K. B.; PATEROVÁ, J.; HEYDA, J.; HILTY, C.; JUNGWIRTH, P.; CREMER, P. S. Molecular mechanisms of ion-specific effects on proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 134, p. 10039-10046, 2012.
- RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6290-6307, 2013.
- ROGERS, R. D.; SEDDON, K. R.; VOLKOV, S. Green industrial applications of ionic liquids. *Springer Science & Business Media*, 92, 2012.
- SAKAI, S.; YUPING, L. Y.; YAMAGUCHI, T.; WATANABE, R.; KAWABE, M.; KAWAKAMI, K. Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electro-spun polyacrylonitrile fibers. *Bioresour Technology*, 101, p. 7344-7359, 2010.
- 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*, 52, p. 49-56, 2008.
- SCHIFFER, C. A.; DOTTSCH, V. The role of protein-solvent interactions in protein unfolding. *Current Opinion in Biotechnology*, 7, p. 428-432, 1996.
- SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K. E.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39, p. 166-170, 2006.
- SEDDON, K. R. Ionic liquids for clean technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68, p. 351-356, 1997.
- SERRA, E.; DÍEZ, E.; DÍAZ, I.; BLANCO, R. M. A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials*, 132, p. 487-493, 2010.

- SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, p. 467-473, 2011.
- SHELDON, R. A. Engineering a more sustainable world through catalysis and green chemistry. *Journal of the Royal Society Interface*, 13, p. 112-119, 2016.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6223-6235, 2013.
- SHELDON, R. Catalytic reactions in ionic liquids. *Chemistry Commun*, 67, p. 2399-2407, 2001.
- SHU, Y.; LIU, M. L.; CHEN, S.; CHEN, X. W.; WANG, J. H. New insight into molecular interactions of imidazolium ionic liquids with bovine sérum albumin. *Journal Chemical Physics B*, 115, p. 12306-12314, 2011.
- 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. *App Biochem Biotechnol*, 79, p. 745-758, 1999.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39, p. 69-76, 2006.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Studies on immobilized lipase in hydrophobic sol-gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 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. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme and Microbial Technology*, 52, p. 141-150, 2013.
- STRAATHOF, A. J. J. Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chemistry Reviews*, 114, p. 1871-1908, 2013.
- SU, F.; PENG, C.; LI, G. L.; XU, L.; YAN, Y. J. Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid. *Renewable Energy*, 90, p. 329-335, 2016.
- TRODLER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *BMC Structural Biology*, 9, p. 1-9, 2009.
- VENTURA, S. P., SANTOS, L. D., SARAIVA, J. A., & COUTINHO, J. A. Concentration effect of hydrophilic ionic liquids on the enzymatic activity of *Candida antarctica* lipase B. *World Journal Microbial Biotechnology*, 28, p. 2303-2310, 2012.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *TrAC Trends Analytical Chemical*, 15, p. 32-38, 1997.
- VILAR, R. B. C.; JESUS, A.; BENVENUTTI, E. V.; SILVA, M. M. Sílica quimicamente modificada com os grupos *p*-anisidina, *p*-fentidina e *p*-fenilenodiamina usada como

adsorvente para Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup> em soluções aquosa e etanólica. *Química Nova*, 31, p. 285-291, 2008.

VILA-REAL, H.; ALFAIA, A. J.; ROSA, J. N.; GOIS, P. M. P.; ROSA, M. E.; CALADO, A. R. T.; RIBEIRO, M. H.  $\alpha$ -Rhamnosidase and  $\beta$ -glucosidase expressed by naringinase immobilized on new ionic liquid sol-gel matrices: activity and stability studies. *Journal Biotechnology*, 152, p. 147-158, 2011.

WANG, X.; CHI, Y.; MU, T. A review on the transport properties of ionic liquids. *Journal Molecular Liquids*, 193, p. 262-266, 2014.

WEB OF SCIENCE. Disponível em:  
<[https://apps.webofknowledge.com/Search.do?product=UA&SID=1EjGE3XIEyLmpvrknn9&search\\_mode=GeneralSearch&prID=ffe36af5-a6c8-4f40-b8f7-ff709875d81e](https://apps.webofknowledge.com/Search.do?product=UA&SID=1EjGE3XIEyLmpvrknn9&search_mode=GeneralSearch&prID=ffe36af5-a6c8-4f40-b8f7-ff709875d81e)>.  
Acessado em 04/01/2017.

WEI, Y.; XU, J.; DONG, H.; DONG, J. H.; QIU, K.; JANSEN-VARNUM, S. A. Preparation and physisorption characterization of D-glucose-templated mesoporous silica sol-gel materials. *Chemistry Materials*, 11, p. 2023-2029, 1999.

WU, C.; ZHOU, G.; JIANG, X.; MA, J.; ZHANG, H.; SONG, H. Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica. *Process Biochemistry*, 47, p. 953-959, 2012.

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*, 70, p. 46-54, 2013.

YANG, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal Biotechnology*, 144, p. 12-22, 2009.

YU, W. H.; TONG, D. S.; FANG, M.; SHAO, P.; ZHOU, C. H. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on MSU-H type mesoporous silica for selective esterification of conjugated linoleic acid isomers with ethanol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 111, p. 43-50, 2015.

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. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65, p. 79-86, 2010.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied Microbial Biotechnology*, 93, p. 61-70, 2012.

ZHAO, B.; LIU, X.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; HE, Y.; GAO, J. Immobilized lipase from *Candida* sp. on hydrophobic silicate: Characterization and applications. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 173, p. 1802-1814, 2014.

ZHAO, D.; LIAO, Y.; ZHANG, Z. Toxicity of ionic liquids. *Clean-soil, air, water*, 35, p. 42-48, 2007.

- ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37, p. 16-25, 2005.
- ZHAO, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, p. 891-907, 2010.
- ZHAO, H. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91, p. 25-50, 2016.
- ZHAO, X.; FENG QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 44, p. 182-197, 2015.
- ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chemistry Science Reviews*, 42, p. 3894-3912, 2013.
- ZOU, B.; HU, Y.; YU, D.; XIA, J.; TANG, S.; LIU, W.; HUANG, H. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. *Biochemical Engineering Journal*, 53, p. 150-156, 2010.
- 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*, 311, p. 62-68, 2014.

## TRABALHOS EXPOSTOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

### ▪ **Resumo apresentado em evento internacional**

BARBOSA, M. S.; SANTOS, A. J.; CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; MARTINS, M. G. F.; CABRERA-PADILLA, R. Y.; SOARES, C. M. F. Effects of hydrophilic or hydrophobic and concentration of the phosphonium-based ionic liquids on the activity of *Burkholderia cepacia* lipase. 26° EUCHEM on Molten Salts and Ionic Liquids. Viena, Áustria, 2016.

### ▪ **Trabalho completo apresentado em evento nacional**

BARBOSA, M. S.; JESUS, F. A.; CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; MARTINS, M. G. F.; CABRERA-PADILLA, R. Y.; SOARES, C. M. F. Uso de solventes verdes com baixa toxicidade para modificação de sílica no processo de imobilização de lipase. COBEQ 2016 - XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Fortaleza - CE, Brasil, 2016.

### ▪ **Palestra apresentada em evento local**

BARBOSA, M. S.; CABRERA-PADILLA, R. Y.; SOARES, C. M. F. Líquidos iônicos à base fosfônio aplicados na biocatálise. 7° Simpósio de Engenharia e Tecnologia. Aracaju - SE, Brasil, 2016.

### ▪ **Resumo aceito em evento internacional**

BARBOSA, M. S.; FREIRE, C. C. C.; CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; MARTINS, M. G. F.; CABRERA-PADILLA, R. Y.; SOARES, C. M. F. Effects of anions variation in phosphonium-based ionic liquids on lipase immobilized by physical adsorption. IMIL 2017- Iberoamerican Meeting on Ionic Liquids. Santos - SP, Brasil, 2017.