



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

FRANCISCO LÚCIO BARBOSA QUARESMA

**PREPARAÇÃO DE SUPORTES MICRO E MESOPOROSOS PARA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E APLICAÇÃO NA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO
OLÉICO**

Belém, PA

2015

FRANCISCO LÚCIO BARBOSA QUARESMA

**PREPARAÇÃO DE SUPORTES MICRO E MESOPOROSOS PARA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E APLICAÇÃO NA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO
OLÉICO**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Luís Adriano Santos do Nascimento

Belém, PA

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Quaresma, Francisco Lúcio Barbosa, 1979-

Preparação de suportes micro e mesoporosos para
imobilização de lipase e aplicação na esterificação do ácido
oléico / Francisco Lúcio Barbosa Quaresma. - 2015.

Orientador: Luís Adriano Santos do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Lipase. 2. Enzimas. 3. Esterificação. 4.
Ácido oleico. 5. Biotecnologia. I. Título.

CDD 22. ed. 572.757

FRANCISCO LÚCIO BARBOSA QUARESMA

**PREPARAÇÃO DE SUPORTES MICRO E MESOPOROSOS PARA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E APLICAÇÃO NA ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO
OLÉICO**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Data da Apresentação: 29 de setembro de 2015.

Conceito: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luís Adriano Santos do Nascimento
Instituto de Ciências Exatas e Naturais – ICEN / UFPA - Orientador

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC / UFPA - Membro

Prof. Dr. Geraldo Narciso da Rocha Filho
Instituto de Ciências Exatas e Naturais – ICEN / UFPA - Membro

Profa. Dra. Luíza Helena de Oliveira Pires
Escola de Aplicação – EA / UFPA - Membro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lúcio e Joana Quaresma,
ao louco do meu irmão Luciano, ao meu
filho (e futuro astronauta) Luiz Felipe e a
minha maravilhosa esposa Cinthya.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida que nos deu.

Aos meus pais Lúcio e Joana Quaresma, por terem me ensinado a andar com minhas próprias pernas e a ser a pessoa que sou atualmente, e ao meu irmão Luciano Quaresma pelos grandes momentos de descontração.

A minha esposa Cinthya Quaresma, por amar infinitamente o cabeça-de-vento que sou e me dar o apoio que preciso nos momentos decisivos da minha vida e ao nosso filho Luiz Felipe Quaresma por me inspirar a buscar e alcançar mais além do que eu poderia imaginar. Amo vocês. Somos um só.

Ao Prof. Dr. Luís Adriano Santos do Nascimento pela orientação durante esta dissertação e por ter dado o apoio nos momentos necessários. Agradeço muito pela paciência e compreensão em situações complicadas.

Ao Prof. Dr. Alberdan Silva Santos pelo apoio disponibilizado através dos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular.

A todos (atualmente presentes ou não) do Laboratório de Catálise e Oleoquímica e Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis, pela ajuda em simples dúvidas até uso e/ou análise em equipamentos. Então, Moisés (valeu, mano!), Miguel, Franklin, Wanderley, Erika, Leandro, Cláudia, Débora, Luís, Paulo e aos demais, muito obrigado.

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar este curso.

Muito obrigado a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui.

Por fim, DESAGRADEÇO imensamente a todos que contribuíram direta ou indiretamente de forma negativa, permanecendo contrários aos meus esforços em concluir esta dissertação. Nesse grupo incluo a Secretaria de Estado de Meio Ambiente de Sustentabilidade (SEMAS), em especial o setor jurídico, que me negou diversas vezes minha solicitação de licença para estudo.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar catalisadores heterogêneos utilizando enzimas imobilizadas nos suportes MCM-41 e metacaulim. Os suportes foram funcionalizados com APTES (uma amina) para aplicação na reação de esterificação do ácido oleico com metanol, para produção de éster. A caracterização do catalisador foi feita por DRX, IV-TF, fisissorção de N₂ e espectrometria de UV. Os resultados apontaram que o MCM-41 foi efetivamente funcionalizado e que as enzimas foram imobilizadas, no entanto, houve perda parcial do arranjo hexagonal desse suporte, enquanto que, para o metacaulim, tanto a funcionalização quanto a imobilização não ocorreram de forma satisfatória. Através da espectrometria de UV, foi verificado que em torno de 80% das enzimas foram efetivamente imobilizadas em MCM-41. Esse biocatalisador (heterogêneo) foi testado na esterificação do ácido oléico (razão molar para ácido oleico/metanol foi de 1:15), à temperatura de 30°C (100 rpm), durante 12h. A conversão obtida através do biocatalisador foi de 52% da massa de ácido em éster, indicando que há viabilidade quanto à utilização da MCM-41 funcionalizado com amina, para a imobilização de lipase, pois atividade catalítica das enzimas foi preservada. Quanto ao metacaulim, os resultados apontaram que, a pesar de ter ocorrido, inicialmente, alguma ligação das enzimas ao metacaulim funcionalizado, a espectrometria de UV apontou que a ancoragem das enzimas não foi eficaz, no decorrer de 4h, no entanto, novas abordagens metodológicas para esse material poderão ser aplicadas para garantir a funcionalização e imobilização eficazes.

PALAVRAS-CHAVE: Lipase. Esterificação. Funcionalização. Suportes. Imobilização. Rejeito.

ABSTRACT

This study aimed to prepare and characterize heterogeneous catalysts using immobilized enzymes in MCM-41 supports and metakaolin. The supports were functionalized with APTES (an amine) for application to the oleic acid esterification reaction with methanol to produce ester. The characterization of the catalyst was made by XRD, FT-IR, physisorption of N₂ and spectrometry of UV. The results show that MCM-41 has been effectively functionalized and immobilized enzymes were, however, there was a partial loss of the hexagonal array of such support, while for metakaolin, both functionalization as immobilization did not occur satisfactorily. Using UV spectrometry, it was found that around 80% of the enzymes were effectively immobilized on MCM-41. This biocatalyst (heterogeneous) was tested in the esterification of oleic acid (molar ratio to oleic acid / methanol was 1:15), at a temperature of 30 °C (100 rpm) for 12h. The obtained conversion was 52% of acid mass to ester, indicating that there viability on the use of MCM-41 amine functionalized for the immobilization of lipase, since catalytic activity of the enzyme was preserved. As for metakaolin, the results showed that, despite having been initially some connection enzymes to metakaolin functionalized, UV spectrometry showed that the anchoring enzyme was not effective in the course of 4 hours, however, new methodological approaches to this material may be applied to ensure the efficient functionalization and immobilization.

KEY WORDS: Lipase. Esterification. Functionalization. Support. Immobilization. Waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reações com triacilglicerol catalisadas por lipases.....	14
Figura 2 – A: Lipase inativa. B: Lipase ativada (ativação interfacial).....	16
Figura 3 – Classificação de imobilização de enzimas.....	18
Figura 4 – Influência da posição da molécula da enzima no suporte.....	20
Figura 5 – A: MCM-41 (hexagonal) e B: MCM-48 (cúbica).....	21
Figura 6 – A: Suporte funcionalizado. B: glutaraldeído.....	22
Figura 7 – Perfil do solo encontrado em áreas com reserva de caulim.....	23
Figura 8 – Estrutura cristalina da caulinita ($\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....	24
Figura 9 – Esquema da síntese do MCM-41.....	28
Figura 10 – A: Funcionalização (metacaulim do rejeito); B: Lavagem com tolueno..	28
Figura 11 – A: Funcionalização do MCM-41. B: Funcionalização e imobilização.....	29
Figura 12 – Isotermas das amostras M41, M41-A e M41-AE.....	33
Figura 13 – Difratogramas das amostras M41, M41-A e M41-AE.....	34
Figura 14 – Estrutura hexagonal do MCM-41 (d_{100} e a_0).....	35
Figura 15 – IV-TF das amostras M41, M41-A e M41-AE.....	36
Figura 16 – Variação de absorbância.....	38
Figura 17 – Variação de absorbância (duplicata).....	39
Figura 18 – Isotermas das amostras MC, MC-A e MC-AE.....	40
Figura 19 – Difratogramas das amostras MC, MC-A e MC-AE.....	41
Figura 20 – IV-TF das amostras MC, MC-A e MC-AE.....	42
Figura 21 – Variação de absorbância.....	43
Figura 22 – Variação de absorbância (duplicata).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplo de aplicações industriais das lipases.....	13
Tabela 2 – Classificação de materiais porosos.....	21
Tabela 3 – Nomenclatura das amostras analisados.....	30
Tabela 4 – Fisissorção de N ₂	33
Tabela 5 – Variação de absorvância.....	37
Tabela 6 – Variação de absorvância (duplicata).....	38
Tabela 7 – Fisissorção de N ₂	40
Tabela 8 – Variação de absorvância.....	43
Tabela 9 – Variação de absorvância (duplicata).....	44

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Lipases	13
2.1.1	Aplicações	13
2.1.2	Estrutura das lipases	14
2.1.3	Mecanismo de atuação das lipases	15
2.2	Imobilização de enzimas	16
2.3	Suportes (materiais meso e microporosos)	20
2.3.1	MCM-41	20
2.3.2	Caulim (metacaulim).....	23
3.	EXPERIMENTAL	26
3.1	Materiais e reagentes	26
3.2	Obtenção dos suportes	27
3.2.1	Metacaulim (rejeito)	27
3.2.2	MCM-41	27
3.3	Funcionalização	28
3.4	Imobilização de enzimas	29
3.5	Nomenclatura das amostras	30
3.6	Caracterização das amostras	31
3.6.1	Fisissorção de N ₂	31
3.6.2	Difração de Raios-X (DRX)	31
3.6.3	Espectroscopia do Infravermelho – Transformada de Fourier (IV-TF)	31
3.7	Esterificação e conversão	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	MCM-41	32
4.1.1	Caracterização	32
4.1.1.1	Fisissorção de N ₂	32
4.1.1.2	Difração de Raios-X (DRX)	34
4.1.1.3	Espectrometria de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV-TF).....	36
4.1.2	Espectrofotometria de UV – Imobilização.....	37
4.1.3	Esterificação e conversão: enzima suportada em MCM-41	39
4.2	Metacaulim (rejeito)	40

4.2.1	Caracterização	40
4.2.1.1	Fisissorção de N ₂	40
4.2.1.2	Difração de Raios-X (DRX)	41
4.2.1.3	Espectroscopia de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV-TF)	42
4.2.2	Espectrofotometria de UV – Imobilização.....	43
4.2.3	Esterificação e conversão: enzima suportada em metacaulim.....	45
5	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas na indústria possui grandes vantagens, devido a fatores como a sua especificidade em reações a substratos bem definidos e sua eficiência catalítica, evitando a formação de subprodutos através de reações inespecíficas (RODRIGUES, 2009). Assim, as enzimas (proteínas, na sua maioria) possuem a função de catalisador específico de reações em diversos processos bioquímicos, afetando a velocidade das mesmas, mas não o equilíbrio químico. No entanto, em condições químicas, físicas e biológicas, as enzimas podem ser inativadas, o que pode ocorrer por desnaturação, as quais perdem sua conformação tridimensional e, conseqüentemente, sua atividade catalítica (NELSON e COX, 2008).

No entanto, para a utilização de enzimas para fins industriais, é necessário que métodos (de imobilização) sejam empregados para garantir a estabilidade das mesmas em condições de desnaturação nos processos. Tal estabilidade está associada a fatores importantes, como uma melhor atividade catalítica, diminuição da contaminação do produto e de custos, bem como a possibilidade de separação e reutilização dessas enzimas em processos contínuos. A imobilização de uma enzima consiste em ligá-la a um suporte sólido, em vesículas ou membranas, transformando-as em um catalisador heterogêneo. Contudo, podem ocorrer efeitos adversos, como a dessorção (liberação) ou a perda da atividade catalítica da enzima (SILVA; SOUZA, 2008).

As enzimas denominadas de Lipases são muito eficientes na catálise de reações como a transesterificação, que ocorre entre óleos vegetais e álcoois de cadeia curta e a esterificação, entre ácidos graxos e carboidratos (sacarose, glicose, frutose, etc.) (PAULA et al., 2005), as quais rendem produtos de grande interesse comercial (CASTRO et al., 2004).

O custo do uso de lipases ainda é elevado e a opção de imobilizar enzimas pode torná-las economicamente viáveis, a nível industrial, contudo, há a necessidade do desenvolvimento de técnicas e materiais apropriados para esse fim (MESSIAS et al., 2011).

A esterificação de ácidos graxos possui grandes vantagens, como a possibilidade de se utilizar resíduos/rejeitos de baixo valor agregado (SUAREZ; MENEGHETTI, 2009), que possuem um custo menor que óleos vegetais virgens utilizados na transesterificação (NASCIMENTO et al., 2011).

No processamento de óleos de alta acidez, como é o caso do óleo de palma, o refino físico é o mais utilizado para a desacidificação e desodorização do óleo. Tal refino é conduzido em uma única etapa, gerando o “destilado de desodorização do óleo de palma” como subproduto (rejeito). Apesar da crescente demanda desse óleo, com grande aplicação do mesmo inclusive na indústria alimentícia, como a maior fonte natural de vitamina A, esse subproduto ainda não é bem utilizado para fins comerciais ou nutricionais, sendo recentes os trabalhos referentes à obtenção de substâncias de interesse a partir desse rejeito (PEIXOTO, 2004).

Nesse contexto, para a aplicação de bons (bio)catalisadores (heterogêneos), a imobilização deve preservar ou melhorar as propriedades cinéticas da enzima, garantindo uma estabilidade a mesma, em condições específicas envolvendo pH, temperatura e solventes, em cada processo (MESSIAS et al., 2011).

Apesar de muitos protocolos já existirem, procedimentos mais simples e eficientes continuam sendo desenvolvidos, considerando a atividade, a estabilidade e a seletividade enzimática, possibilitando síntese em condições específicas ou especiais de moléculas bioativas muito complexas para diferentes aplicações e com uma relação de custo-benefício cada vez melhor. No entanto, para se alcançar o resultado desejado, de acordo com cada aplicação, é importante a escolha adequada do suporte e do tipo de imobilização para se alcançar as propriedades desejadas dos derivados imobilizados. A imobilização de enzimas é desafio interdisciplinar moderno e árduo, pois depende do conhecimento de áreas diferentes como a biologia molecular, a química das proteínas, ciência dos materiais, a engenharia química e outras (GUISAN, 2006).

Assim, este trabalho teve como objetivo geral preparar e caracterizar o catalisador heterogêneo obtido a partir da imobilização de lipase em MCM-41 e metacaulim (obtido a partir de um rejeito do caulim) e aplicá-lo em reações de esterificação com ácido oleico. Os objetivos específicos foram: funcionalizar dois suportes (metacaulim e MCM-41) utilizando uma amina; ancorar enzimas em cada suporte, obtendo-se um catalisador heterogêneo; caracterizar os materiais obtidos nas etapas de funcionalização e imobilização; aplicar o catalisador obtido em reações de esterificação com ácido oléico, com metanol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipases

2.1.1 Aplicações

Enzimas (proteínas, na sua maioria) possuem a função de catalisador específico de reações em diversos processos bioquímicos, afetando a velocidade das mesmas, mas não o equilíbrio químico (NELSON; COX, 2008). A utilização dessas macromoléculas na indústria possui grandes vantagens (Tabela 1), devido a fatores como a sua especificidade em reações a substratos bem definidos e sua eficiência catalítica, evitando a formação de subprodutos através de reações inespecíficas (RODRIGUES, 2009).

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres de glicerol e ácidos graxos (JAEGER; REETZ, 1998). Metabolicamente, as lipases estão presentes nos adipócitos e em sementes em germinação e catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para a liberação de ácidos graxos para serem transportados até locais onde são necessários como combustíveis celulares (NELSON; COX, 2008).

Tabela 1 – Exemplo de aplicações industriais das lipases. Adaptado de Castro et al. (2004).

Setor	Efeito Utilizado	Produto
Alimentício		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para produtos lácteos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saque, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais Hidrólise de óleos (ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos)	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
Químico		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro

A aplicação das lipases em diversos processos biotecnológicos tem aumentado progressivamente, contudo, muitos genes que codificam lipase ainda precisam ser identificados e, com isso, muitas enzimas com novas propriedades serão descobertas. Nesse contexto, as lipases são consideradas como biocatalisadores do futuro, visto que, a melhoria de condições reacionais para o uso das lipases mais eficientes possibilitará a produção de produtos químicos e farmacêuticos de alto valor (JAEGER; EGGERT, 2002), além da aplicação na resolução de misturas racêmicas, como ferramenta em diagnósticos clínicos, no desenvolvimento de aromas, na composição de cosméticos e no desenvolvimento de biossensores (HASAN et al., 2006).

As lipases são muito eficientes na catálise de reações como a transesterificação (óleos vegetais e álcoois de cadeia) e a esterificação, que pode ocorrer entre ácidos graxos e carboidratos (sacarose, glicose, frutose, etc.) (PAULA, et al., 2005), as quais rendem produtos de grande interesse comercial, mas também atuam como biocatalisadores de muitas outras reações. Outra reação importante é a interesterificação que consiste em um rearranjo das cadeias carbônicas ligadas à molécula de glicerol, possibilitando a obtenção de óleos e gorduras com propriedades desejáveis (CASTRO et al., 2004). Na Figura 1, é mostrado um esquema com reações catalisadas por lipases.

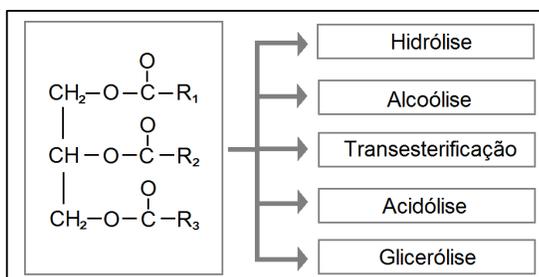


Figura 1 – Reações com triacilglicerol catalisadas por lipases. Adaptado de Castro et al. (2004).

2.1.2 Estrutura das lipases

Em geral, as enzimas, assim como todas as moléculas proteicas, são formadas por aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas. A sequência e distribuição desses aminoácidos influenciam a *conformação* da molécula, que consiste no arranjo espacial dos átomos. A estrutura tridimensional das enzimas pode ser

classificada em: *primária*, *secundária*, *terciária* e *quaternária*. A estrutura primária corresponde à sequência linear dos aminoácidos na cadeia peptídica. Na estrutura secundária, ocorre o dobramento molecular, podendo originar duas estruturas conhecidas como α -hélices e folhas β . Na estrutura terciária, a estrutura sofre dobramento espacial maior, com distribuição das α -hélices e folhas β em posições que garantem a funcionalidade da molécula. A estrutura quaternária ocorre quando mais de uma cadeia tridimensionalmente estruturada (subunidade) se juntam, formando uma unidade proteica (NELSON; COX, 2008).

Segundo a Classificação Estrutural de Proteína (SCOP – *Structure Classification of Protein*), de acordo com Murzin et al. (1995), as proteínas podem ser agrupadas por: classe, dobra, superfamília e família. Na classe, as proteínas podem ser classificadas como:

- Totalmente alfa (α): proteínas com estrutura secundária formada por α -hélices;
- Totalmente beta (β): proteínas com estrutura secundária formada por folhas β ;
- Alfa e beta (α/β): proteínas com α -hélices e folhas β misturadas (β - α - β);
- Alfa mais beta ($\alpha+\beta$): proteínas com α -hélices e as folhas β separadas (ausência de β - α - β);
- Multidomínio: proteínas com diferentes dobras, sem uma estrutura definida.

2.1.3 Mecanismo de atuação das lipases

A interação entre uma enzima e seu substrato, inibidor, receptor ou ligante depende do tipo de reconhecimento molecular, que é facilitado através do contato superficial da enzima, que possibilita a detecção do ambiente que a rodeia. Essa interação inicia mediante ações de forças eletrostáticas de interações intermoleculares, em um raio que pode variar entre 10 Å e 15 Å, dependendo do solvente, temperatura e carga líquida da molécula. Assim, quanto menor a rigidez dielétrica do meio e a temperatura, o raio de ações das forças intermoleculares aumenta potencializando, conseqüentemente, a interação da enzima com o meio. As lipases possuem uma superfície com arranjo esférico e distribuição específica de resíduos de aminoácidos que influenciam drasticamente parâmetros funcionais dessas

moléculas, tais como a estabilidade térmica, especificidade a substrato, atividade enzimática e pH ótimo (PETERSEN et al., 2001).

Em geral, a atividade hidrolítica das lipases é ativada por um mecanismo denominado de *ativação interfacial*, que depende da “concentração micelar crítica” (CMC), que corresponde à quantidade de moléculas de ésteres (monômeros) capaz de formar micelas, em meio aquoso. Quando a concentração de micelas está abaixo do CMC, as lipases apresentam pouca atividade hidrolítica, pois, para a ativação interfacial tem que haver a exposição de uma região extremamente hidrofóbica (JAEGER e REETZ, 1998).

As lipases possuem uma tríade catalítica formada por três resíduos dos aminoácidos serina, histidina e glutamina, os quais compõem o sítio ativo da enzima e estão situados em folha- β que está localizada na cavidade que é exposta, quando a enzima está em estado ativado (ativação interfacial) (CYGLER et al., 1999), como pode ser observado na Figura 2, onde são mostrados os dois estados da enzima: aberto e fechado. Nessa mesma figura, as cores vermelhas e azuis representam, respectivamente, potenciais eletrostáticos negativos e positivos considerando os estudos de Cygler et al. (1999) e Petersen et al. (2001).

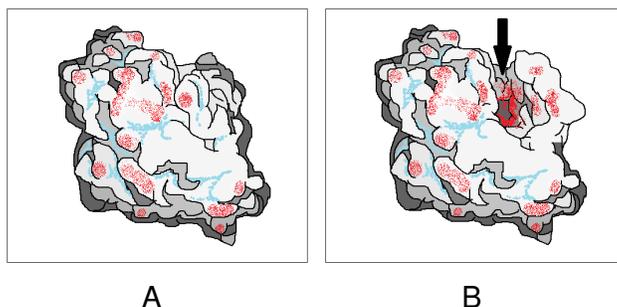


Figura 2 – A: Lipase inativa. B: Lipase ativada (ativação interfacial). Adaptado de Cygler et al. (1999).

2.2 Imobilização de enzimas

Desde o início do século passado, a imobilização de macromoléculas já era um assunto discutido experimentalmente, como observado em estudo realizado por Nelson e Griffin (1916), através do qual, demonstraram os efeitos de diferentes colóides na atividade catalítica e adsorção em carvão ativado da enzima invertase.

No entanto, somente em 1971, a partir da 1ª Conferência de Engenharia de Enzima, ocorrida em Nova Hampshire – EUA, o termo “enzima imobilizada” passou a ser adotado, sendo sugerido por Ephaim Katchalski-Katzir e foi conceituado como biocatalisador fisicamente confinado em certas regiões definidas, com retenção de sua atividade catalítica, a qual pode ser usada continuamente e repetidamente (KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

Quanto à aplicação industrial, em geral, as enzimas apresentam três desvantagens, que são: a instabilidade em condições operacionais, com a perda de sua atividade catalítica, devido a fatores como à auto-oxidação, autodigestão ou desnaturação; dificuldade de serem recuperadas de substratos e produtos, por estarem operando em sistema aquoso; e o rendimento espaço-tempo é frequentemente baixo devido à tolerância limitada de enzimas a concentrações elevadas de substrato(s) e produto(s) (FABER, 2011).

Para a utilização de enzimas para fins industriais, é necessário que métodos (de imobilização) sejam empregados para garantir a estabilidade das mesmas em condições de desnaturação nos processos. Tal estabilidade está associada a fatores importantes, como o aumento da atividade catalítica, a diminuição da contaminação do produto e de custos, bem como a possibilidade de separação e reutilização dessas enzimas em processos contínuos. A imobilização de uma enzima consiste em ligá-la a um suporte sólido, em vesículas ou membranas, transformando-as em um catalisador heterogêneo. Contudo, podem ocorrer efeitos adversos, como a dessorção (liberação) da macromolécula do suporte ou a perda da atividade catalítica da enzima (SILVA; SOUZA, 2008).

As enzimas imobilizadas são altamente versáteis e podem ter diversas aplicações, como na química fina, em diversas reações diferentes, utilizadas na química dos alimentos e em terapêuticas, dentre outros. No entanto, para se alcançar o resultado desejado, de acordo com cada aplicação, é importante a escolha do suporte e do tipo de imobilização para se alcançar as propriedades desejadas do biocatalisador, no meio reacional em que a enzima imobilizada vai ser utilizada ou testada. A imobilização de enzimas pode ser feita em diversos tipos de meios reacionais, tais como o aquoso, solventes orgânicos anidros, fluidos supercríticos e líquidos iônicos. Em geral, as enzimas interagem por adsorção ou ligação covalente com os suportes ativados que podem possuir resíduos

nucleofílicos, bolsas hidrofóbicas, grupos carboxílicos e/ou regiões com carga líquida positiva ou negativa (GUISAN, 2006).

Em publicação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC) feita em 1995, são apontadas características químicas e a uma classificação da imobilização de enzimas em quatro tipos:

1. Ligação covalente da enzima a uma matriz insolúvel em água;
2. Ligação cruzada intermolecular de moléculas de enzima utilizando reagentes multifuncionais;
3. Adsorção da enzima sobre uma matriz insolúvel em água; e
4. Aprisionamento de enzima em uma estrutura polimérica insolúvel em água ou uma membrana semipermeável.

No entanto, outros autores apontam outras formas de classificação dos métodos de imobilização, como destacado na Figura 3, onde é mostrada outra classificação desses métodos, os quais são agrupados, de acordo com Tischer e Wedekind (1999), em três grupos: ataque a transportador (suporte); reticulação; e encapsulamento/inclusão. Essa classificação, apesar de referir-se a um estudo publicado apenas 04 anos após a IUPAC (1994), possui uma estrutura mais detalhada.

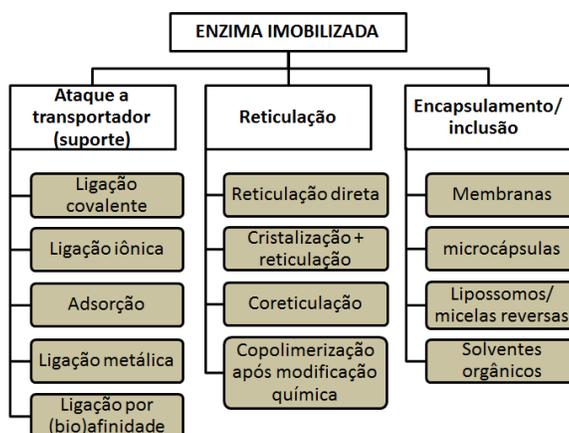


Figura 3 – Classificação de imobilização de enzimas. Adaptado de Tischer; Wedekind (1999).

Com a imobilização de enzimas obtém-se (bio)catalisadores heterogêneos, que, de acordo com Campanati et al., 2003, são definidos como sólidos (ou misturas de sólidos) que aceleram a velocidade de uma determinada reação química, sem sofrer alterações. No entanto, a atividade catalítica de um catalisador pode variar significativamente, dentro de poucos minutos ou durar anos, dependendo de seu uso e tempo de serviço.

O custo do uso de lipases ainda é elevado e a opção de imobilizar essas enzimas pode torná-las economicamente viáveis, a nível industrial, contudo, há a necessidade do desenvolvimento de técnicas e materiais apropriados para esse fim (MESSIAS et al., 2011). Nesse contexto, a imobilização de catalisadores (ácidos, básicos ou enzimáticos) parece ser a alternativa certa, possibilitando o uso mínimo de solventes (incluindo água) e energia, com destaque para os suportes sólidos e líquidos iônicos (DUPONT et al., 2009). Assim, para se alcançar o resultado desejado, de acordo com cada aplicação, é importante a escolha adequada do suporte e do tipo de imobilização, para se alcançar as propriedades desejadas dos derivados imobilizados. A imobilização de enzimas é um desafio interdisciplinar moderno e árduo, pois depende do conhecimento de áreas diferentes como a biologia molecular, a química das proteínas, ciência dos materiais, a engenharia química e outras (GUISAN, 2006). Para isso, a imobilização deve preservar ou melhorar as propriedades cinéticas da enzima, garantindo uma estabilidade a mesma, em condições específicas envolvendo pH, temperatura e solventes, em cada processo (MESSIAS et al., 2011).

Apesar de muitos protocolos já existirem, procedimentos mais simples e eficientes continuam sendo desenvolvidos, considerando a atividade, a estabilidade e a seletividade enzimática, possibilitando sínteses em condições específicas ou especiais de moléculas bioativas muito complexas para diferentes aplicações e com uma relação de custo-benefício cada vez melhor (GUISAN, 2006).

No entanto, uma das maiores preocupações é a diminuição da atividade catalítica da enzima devido à imobilização, cujas causas estão relacionadas com o ataque de muitos resíduos de aminoácidos no suporte, com aumento da deformação estrutural dessas proteínas, sendo destacados a lisina, a cisteína, o aspartato e a tirosina, como os aminoácidos envolvidos na imobilização da macromolécula no suporte, via ligação covalente (RAO; ANDERSON; BACHAS, 1998).

No caso da adsorção, ocorre uma interação da enzima com o suporte através de forças intermoleculares e apesar de haver pouca possibilidade da interação da macromolécula com o suporte causar deformidade estrutural na enzima, como ocorrer com a ligação covalente, outros problemas podem ocorrer, como a inativação da enzima devido à impossibilidade de exposição do sítio catalítico e consequente inativação na molécula, como mostrado na Figura 4.

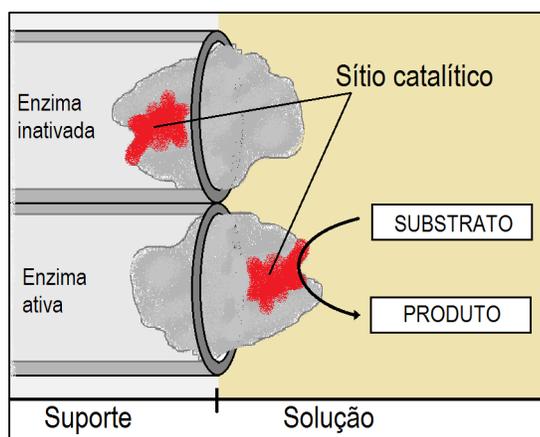


Figura 4 – Influência da posição da molécula da enzima no suporte. Adaptado de Díaz et al. (1996).

Apesar de haver alguma perda de atividade catalítica, devido à interação da enzima com substrato, o biocatalisador pode apresentar um funcionamento estável em longo prazo, com estabilidade a temperaturas elevadas (acima da temperatura ótima da enzima livre), tendo a sílica como suporte (CRUZ et al., 2009).

2.3 Suportes (materiais meso e microporosos)

2.3.1 MCM-41

Para a imobilização de enzimas, muitos sólidos são utilizados como suportes, podendo ser aplicados materiais denominados de peneiras moleculares, devido a sua estrutura é porosa. Assim, segundo IUPAC (1982), citado por Machado (2010), esses materiais são classificados de acordo com o tamanho dos poros em: microporosos, mesoporosos e macroporosos (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação de materiais porosos

Material poroso	Tamanho de poro (nm)
Macroporoso	>50
Mesoporoso	2 a 50
Microporoso	<2

As indústrias têm gerado grandes avanços, em serviços e produtos, em diversas áreas, mas também trouxeram a necessidade de se dar o destino adequado ou evitar a geração de resíduos, líquidos, sólidos e gasosos. Por exemplo, o CO₂, que é um gás do efeito estufa, tem sido alvo de estudos voltados a sua captura, possibilitando a criação de filtros, como mostrado em trabalhos como os realizados por Srivastava, et al. (2006) e por Barbosa (2009), através da modificação (funcionalização) dos materiais mesoporosos SBA-15 e MCM-41, respectivamente.

A sílica é amplamente utilizada como suporte, devido à estabilidade química da matriz inorgânica, além de poder adsorver moléculas bem grandes, por causa do elevado volume de poro (1 cm³/g) e manter as propriedades químicas da molécula imobilizada. Dentre os suportes mesoporosos, destacam-se, além do MCM-41 (arranjo hexagonal) MCM-48 e o MCM-50, que são óxidos de silício, cujas estruturas são, respectivamente, cúbicas e lamelares. Na Figura 5 estão representados os arranjos tridimensionais do MCM-41 e do MCM-48. Outros materiais mesoporosos têm sido sintetizados, como o SBA-15, que possui estrutura hexagonal e grande área superficial (MACHADO et al., 2010).

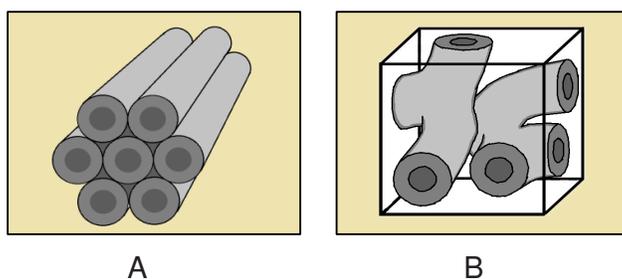


Figura 5 – A: MCM-41 (hexagonal) e B: MCM-48 (cúbica). Adaptado de Machado et al., 2010.

Na síntese do MCM-41, é utilizada uma fonte de sílica e um surfactante, para formar micelas que servem como molde durante a formação da estrutura do material, como pode ser observado em diversos protocolos seguidos em extensa literatura científica disponível. O tetraetilortosilicato (ou tetraetoxisilano – TEOS) é um organosilicato muito aplicado como fonte de sílica na síntese do MCM-41, sendo aplicado como agente direcionador (molde) o brometo de hexadeciltrimetilamônio (ou brometo de cetiltrimetilamônio – CTAB), durante a síntese (GRÜN et al., 1999; CAI et al., 1999; RITTER et al., 2009; SZEGEDI et al., 2011). A utilização de moldes moleculares com tamanhos de cadeia carbônica (hidrofóbica) diferentes pode ser aplicada no controle do diâmetro dos poros durante a síntese do MCM-41, devido às micelas formadas possuírem dimensões diversas (GRÜN et al., 1999).

As MCM's são amplamente aplicadas como suportes e muitos protocolos têm sido criados, visando obter menor custo operacional e maior eficiência (CAI et al., 1999; SCHUMACHER; UNGER, 1999). Muitos estudos têm sido realizados, principalmente com materiais mesoporosos (e microporosos), visando à criação de catalisadores para atuarem em reações específicas (ATHENS et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2011c).

Para o suporte atuar como biocatalisador, ele deve ser funcionalizado (ativado), o que ocorre através da ligação de moléculas reativas no material poroso (ATHENS et al., 2009). As primeiras ativações (funcionalizações) foram feitas com glutaraldeído (pentanodial), obtendo-se suportes funcionalizados capazes de se ligar de forma covalente a grupos amino terminal de proteínas, em pH entre 7 e 8 (BARBOSA et al., 2012).

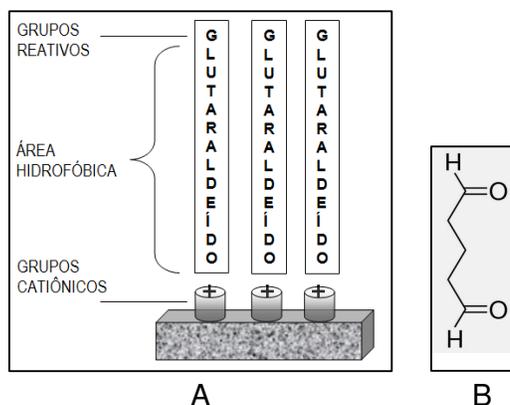


Figura 6 – A: Suporte funcionalizado. B: glutaraldeído. Adaptado de Barbosa et al. (2012).

Na Figura 6 é demonstrada, esquematicamente, moléculas de glutaraldeído ligados a um suporte em uma extremidade e, na outra, grupo hidroxila (-OH), quimicamente reativo.

Apesar do uso “clássico” do glutaraldeído, na funcionalização de suportes, Barbosa et al. (2012) demonstraram, recentemente, a versatilidade dessa molécula na obtenção de biocatalisadores, causando alterações na conformação da estrutura tridimensional de lipases em geral, com efeitos nos centros ativos, dependendo de diferentes orientações da funcionalização.

Além do glutaraldeído, algumas aminas têm sido utilizadas na funcionalização do mesoporos, como o MCM-41, visando obter catalisadores. Dentre as aminas com aplicadas visando à imobilização de enzimas tem sido utilizados o 3-aminopropiltriétoxissilano – APTES e 3-aminopropiltrimetoxissilano - APTMS.

2.3.2 Caulim (metacaulim)

O caulim é um argilomaterial refratário, pois mantém a forma original sem fender, abrir ou lascas, resistindo a grandes variações de temperatura, dissipando rapidamente a energia térmica (MARTELLI, 2006). Na indústria de fabricação de papel, o caulim tem grande aplicação na cobertura desse produto, o qual é extraído de jazidas, sendo que o caulim aplicado para esse fim comercial é denominado de macio (*soft*) e é encontrado em extratos no solo, cobertos por uma camada de caulim duro (*flint*), sem aplicação industrial, devido ao seu teor de ferro (CARNEIRO et al., 2003). Na Figura 7, está representado o perfil do solo onde são encontradas as camadas de caulins.

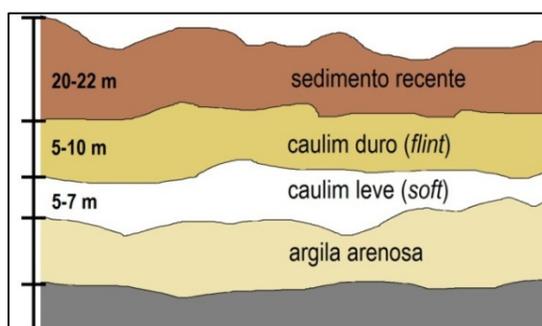
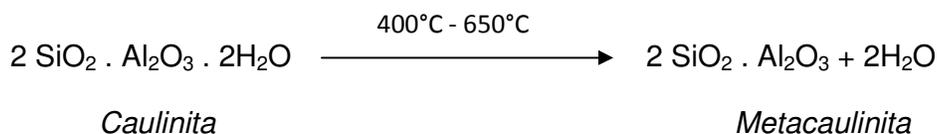


Figura 7 – Perfil do solo encontrado em áreas com reserva de caulim. Adaptado de Carneiro et al. (2003).

No entanto, os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} podem ser removidos por separação magnética, contudo a remoção não é completa, pois somente o Ferro encerrado entre as camadas octaédrica e hexaédricas é, de fato, retirado por este método, permanecendo o Fe presente em algumas estruturas octaédricas (SANTOS et al., 2012).

A caulinita é o principal mineral presente no caulim, contudo, com aquecimento essa argila sofre decomposição térmica, podendo ser distinguidas cinco etapas durante esse processo, de acordo com o aumento da temperatura (T): 1 ($T < 100^\circ\text{C}$): evaporação da água adsorvida no poros; 2 ($100^\circ\text{C} < T < 400^\circ\text{C}$): perda de hidroxilas, com reorganização das camadas octaédricas; 3 ($400^\circ\text{C} < T < 650^\circ\text{C}$): perda de hidroxila da caulinita e formação da metacaulinita; 4 ($500^\circ\text{C} < T < 900^\circ\text{C}$) decomposição do mineral alunita, obtendo-se K_2SO_4 , Al_2O_3 e SO_3 ao final do intervalo de temperatura (KAKALI et al., 2001).



De acordo com estudo realizado por Santos et al. (2012) com o caulim da região do rio Capim, no Estado do Pará/Brasil, o principal argilomineral que compõe o caulim é a caulinita (Figura 8), apresentando grandes quantidades de Al_2O_3 e de SiO_2 , havendo ocorrência em porcentagens bem menores de outros óxidos, tais como: Fe_2O_3 , TiO_2 , CaO , MgO , Na_2O e K_2O , dos quais destacam-se os dois primeiros, pois o Fe podem substituir o Al, formando estrutura cristalina octaédrica, tanto com Fe^{3+} quanto com Fe^{2+} .

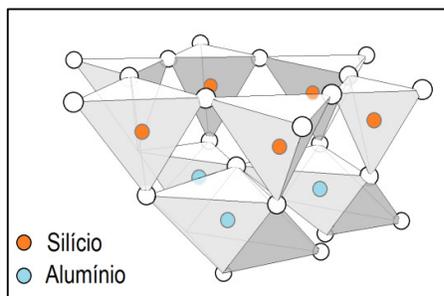


Figura 8 – Estrutura cristalina da caulinita ($\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Adaptado de Martelli (2006).

De acordo com Martelli (2006), a fórmula teórica da caulinita é $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, sendo esperadas as seguintes porcentagens em amostras de caulim: 39,50% de Al_2O_3 , 46,50% de SiO_2 e 13,9% de H_2O .

Caulins de origens distintas possuem características diferentes. Em estudo realizado por Qiu et al. (2014), caulins de origem brasileira e chinesa foram comparados, sendo destacado que suas propriedades químicas, morfologias e características de superfície são diferentes em decorrência, provavelmente, da estruturas cristalinas.

O caulim proveniente de Fujian (província da República Popular da China), comercializado pela empresa Longyan Kaolin Co, possui 88% de caulinita e 12 % de quartzo, com área superficial de $3,67 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (ZHANG et al., 2010). O caulim originado no planalto de El-Teeh, Sinal, Egito, possui grande quantidade de Fe_2O_3 e TiO_2 .

Atualmente, muitos materiais diferentes, sendo a maioria de baixo custo, vêm sendo estudados, visando à imobilização de enzimas, destacando o uso da casca de coco verde (BRÍGIDA, 2010), dentre outros. Por outro lado, outros materiais, como o grafeno (alótomo do carbono) tem aplicação muito requisitada em diversas áreas, devido a suas propriedades, sendo um material que não apresenta custo baixo para sua obtenção e aplicação como suporte, mas que, no entanto, seu uso na imobilização de enzimas, vem sendo estudado (ZHANG et al., 2010; LI, et al., 2013).

Na literatura científica há muitos estudos que destacam a muitas aplicações do caulim, como a imobilização de metais, visando, em geral: à síntese de catalisadores heterogêneos para síntese de biodiesel (WEN et al.,2010) ou a remediação de áreas contaminadas por metais pesados (ZHANG et al., 2010) ou até por radionuclídeos (EL-NAGGAR, 2014).

Seguindo o pensamento de aplicar materiais de baixo custo para a obtenção de catalisadores heterogêneos, o caulim do tipo *flint* (rejeito), microporoso, tem sido estudado para esse fim, após ativação, para obtenção de alquil ésteres (biodiesel) (NASCIMENTO et al., 2011a; NASCIMENTO et al., 2011b). Assim, a utilização de catalisadores sintetizados a partir de rejeitos de caulim tem mostrado que esse material é eficiente, podendo ser aplicada inclusive na imobilização de rejeitos de radionuclídeos presentes no meio ambiente, facilitando sua remoção posterior (EL-NAGGAR, 2014).

3. EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes

O rejeito de caulim utilizado neste estudo foi obtido diretamente de uma das bacias de rejeito da empresa CADAM, localizada no distrito de Monte Dourado, no município de Almerim/PA. Foi utilizada mufla (Quimis), para calcinação do rejeito. Hidróxido de potássio, em pastilhas.

Para a síntese do MCM-41, foram utilizados: surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (brometo de hexadeciltrimetilamônio – CTAB), com a seguinte fórmula: $(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$, fabricado pela Sigma-Aldrich; o tetraetilortosilicato (TEOS, da Sigma-Aldrich), de fórmula $Si(OC_2H_5)_4$, foi a fonte de silício formadora da estrutura do suporte.

Além desses reagentes, foi utilizado o hidróxido de amônio (NH_4OH), hidróxido de sódio ($NaOH$) e fenolftaleína. Foi utilizado também: balão volumétrico de fundo chato ou redondo, de 500 ml; termômetro; bomba de vácuo; papel de filtro; funil de Buchner; kitassato.

As enzimas foram fornecidas pelo laboratório de Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (LabISisBio). As amostras foram realizadas em espectrofotômetro de UV-VIS (Quimis), para verificação de absorvância

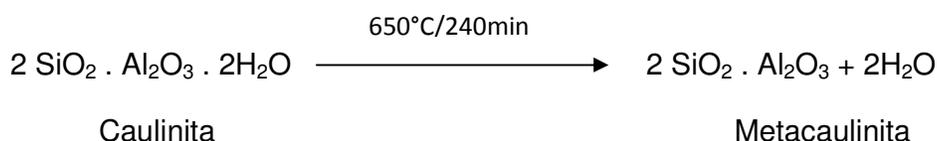
As análises de Fisissorção (adsorção/dessorção) de nitrogênio foram feitas no Laboratório de Catálise e Oleoquímica – LCO/UFPA, através do equipamento Micrometrics – Tristar II – Surface Area e Porosity. A análise dos materiais por difração de raios-X (DRX) foi realizada no laboratório de difração de Raios-X, do Instituto de Geociências, da UFPA, utilizando-se difratômetro Philips (PW 3710), com ânodo de cobre (radiação $K\alpha$, com $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Quanto à espectrometria de Infravermelho, as análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis – LAPAC/UFPA e em laboratório analítico do Instituto de Farmácia/UFPA. A reação de esterificação foi realizada em reator Parr Series 5000 Multiple Reactor System.

Os testes catalíticos, referentes à síntese do biodiesel a partir do DDOP, por meios das enzimas imobilizadas em metacaulim e MCM-41, foram realizados do Laboratório de Catálise e Oleoquímica – LCO/UFPA e nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (LabISisBio).

3.2 Obtenção dos suportes

3.2.1 Metacaulim (rejeito)

Para obtenção do metacaulim, amostras do rejeito foram colocadas em cápsula de porcelana e calcinadas à temperatura de 650 °C, em mufla, por 4 h (Figuras 11). Após resfriamento o material obtido foi armazenado em recipiente de polietileno. A transformação de fase da caulinita para metacaulinita está representada abaixo:



3.2.2 MCM-41

O MCM-41 foi sintetizado com base no método utilizado por Cai, et al (1999). A síntese foi realizada em sistema fechado, sendo adicionado 1 g de CTAB em solução formada por 205 ml de hidróxido de amônio (NH₄OH) e 270 ml de água destilada, aquecida até 80°C, em intensa agitação, visando à total dissolução do surfactante. Após esse tempo, foi adicionado, gota a gota, 10 ml de TEOS. A síntese do MCM-41 está esquematizada na Figura 9.

Após adição completa da fonte de sílica, o sistema permaneceu em agitação e aquecido durante 2 h. Em seguida, a suspensão foi filtrada a vácuo e o sólido branco obtido foi armazenado em dessecador, por 24 h, para secagem completa. Após remoção de unidade, o sólido recuperado foi transportado para um tubo em “T” para ser calcinado em forno tubular.

Para execução da calcinação, o forno foi utilizado com a seguinte programação: temperatura: 550 °C; rampa de aquecimento: 5 °C/min; tempo de calcinação: 240 min (4 h). Após resfriamento, o MCM-41 sintetizado foi armazenado em frascos de polietileno, para ser posteriormente funcionalizado.

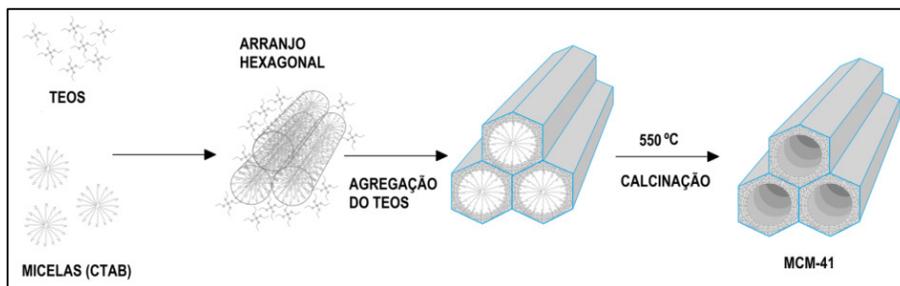


Figura 9 – Esquema da síntese do MCM-41. Adaptado de Beck et al. (1992).

3.3 Funcionalização

Para funcionalização dos suportes (MCM-41 e metacaulim) foi aplicada a metodologia utilizada por Shah et al., 2008 e Wanga, et al., 2012, com utilização da amina 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) e tolueno. No procedimento, em balão de fundo redondo, com duas bocas, cada 1 g de suporte foi adicionado em uma mistura de 15 ml de tolueno e 0,93 ml da amina, formando uma suspensão que foi aquecida até 110 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 h, sob agitação, em manta aquecedora. Na vidraria foi acoplado um condensador, para garantir o refluxo do tolueno evaporado.

Após esse tempo de 2h, o material foi filtrado a vácuo e seco à temperatura de 38°C, por 2h. Para remoção do excesso de amina, o material foi lavado com tolueno em separador soxhlet, com condensador (para refluxo). Após aquecimento, as sifonadas ocorreram, em média, de 1/5min, totalizando de 8 a 10 lavagens (Figura 10). Para garantir evaporação total do tolueno, o material obtido foi seco à temperatura de 38 °C, por 4 h, e, posteriormente, armazenado em recipientes de polietileno.

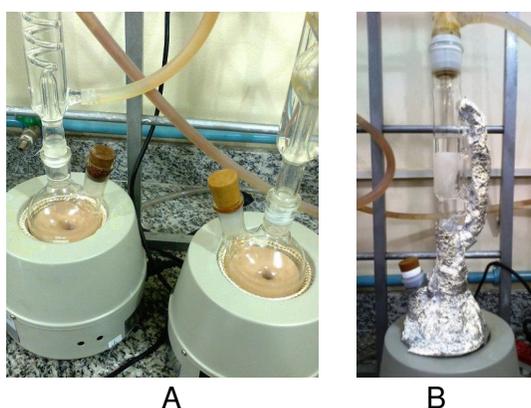
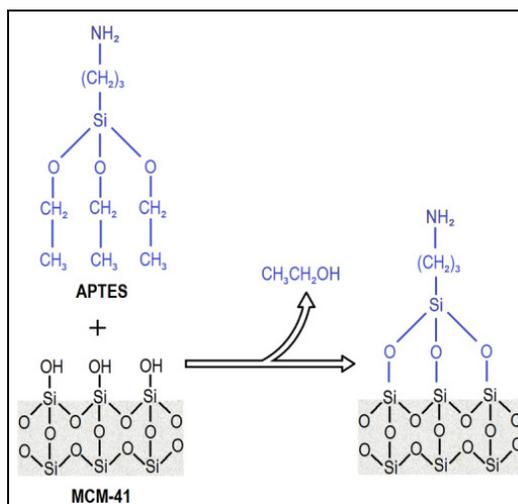
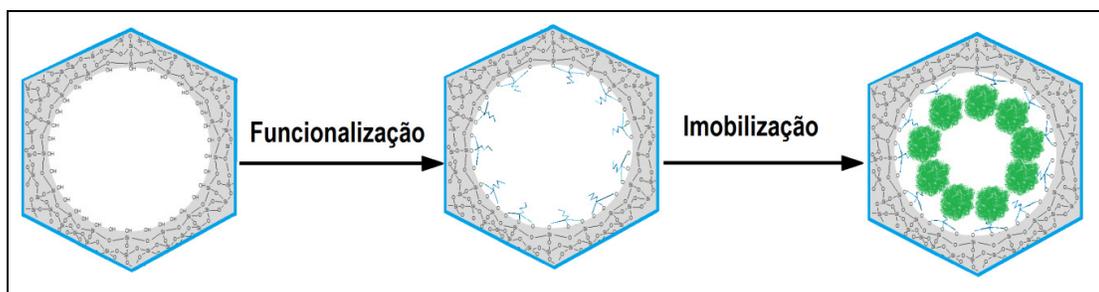


Figura 10 – A: Funcionalização (metacaulim do rejeito); B: Lavagem com tolueno.

A partir da funcionalização dos suportes, a amina incorporada, liga-se a superfície. As etapas de funcionalização e imobilização estão demonstradas em esquema na Figura 11.



A



B

Figura 11 – A: Funcionalização do MCM-41. B: Funcionalização e imobilização. Adaptado de BAI et al. (2012).

3.4 Imobilização de enzimas

As enzimas foram fornecidas pelo LabISisBio em meio líquido (extrato) e permaneceram resfriadas abaixo de 5 °C durante a imobilização, objetivando evitar a ação de proteases bacterianas, que pudessem estar presentes.

Para realização da imobilização, foram utilizados volumes de 6 ml de extrato enzimático, em tubo falcon, sendo adicionada a quantidade de 250 mg de suporte funcionalizado (**M41-A** ou **MC-A**), em cada tubo. As quantidades foram definidas

com o objetivo de obter amostras em quantidades suficientes para as análises e testes.

Logo após adição do suporte ao extrato enzimático e breve agitação manual, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 5 min, para precipitação dos sólidos (suporte com enzima imobilizada). Em seguida, foi medido o pH, através de fita de teste rápido, e depois foi feita a espectrofotometria de UV, utilizando-se o método de Bradford, para se evidenciar alteração na absorvância.

Durante a imobilização das amostras, a cada 1h, os procedimentos acima mencionados foram refeitos até não ser mais observada variação de absorvância, admitindo-se, nesse ponto, a máxima capacidade de imobilização das enzimas possível pelo suporte. Assim, as medições ocorreram pela manhã e à tarde.

Entre cada medição de absorvância, as amostras permaneceram armazenadas em caixa de isopor com gelo. Para cada amostra de suporte em solução enzimática, o procedimento seqüencial foi executado em duplicata, devido a pouca quantidade de cada amostra.

Para as amostras formadas pelo extrato enzimático e o suporte funcionalizado, os valores listados em tabela e plotados correspondem às variações de absorvâncias, sendo considerado o branco da análise (água destilada) como 0,00% (mínima) e 100% (máxima) para as amostras contendo apenas o extrato enzimático.

Após filtração e secagem em dessecador, por 24h, o sólido obtido foi armazenado em tubo eppendorf.

3.5 Nomenclatura das amostras

Visando organizar as amostras em cada etapa executada durante o estudo, foi definida nomenclatura específica, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Nomenclatura das amostras analisados.

Suportes	Siglas
Metacaulim não funcionalizado	MC
Metacaulim funcionalizado com amina	MC-A
Metacaulim funcionalizado com amina/enzima imobilizada	MC-AE
MCM-41 não funcionalizado	M41
MCM-41 funcionalizado com amina	M41-A
MCM-41 funcionalizado com amina/enzima imobilizada	M41-AE

3.6 Caracterização das amostras

3.6.1 Fisissorção de N₂

Para a obtenção de propriedades texturais, foi feita a análise de Fisissorção de N₂, sendo que todas as amostras passaram por tratamento térmico prévio, para remoção de substâncias que pudessem interferir na leitura do aparelho, como a água. Em seguida, as amostras foram analisadas e foram obtidos resultados de volume (V_p) e tamanho de poro (T_p) por meio do método de Barret–Joyner–Halenda (BJH), enquanto que, para a área superficial (A_s), o método aplicado foi o Brunauer–Emmett–Teller (BET).

Os dados obtidos foram utilizados para acompanhar a evolução dos efeitos das etapas de funcionalização e imobilização de enzimas, no MCM-41 e no metacaulim, assim como também comparar os dados obtidos com os da literatura disponível.

3.6.2 Difração de Raios-X (DRX)

As análises foram feitas no laboratório de Difração de Raios-X, do Instituto de Geologia/UFPA, onde, previamente, as amostras foram compactadas e então levadas ao difratômetro, cujos resultados foram, posteriormente, disponibilizados para compor o presente estudo. Para a plotagem dos difratogramas a partir desses resultados.

3.6.3 Espectroscopia do Infravermelho – Transformada de Fourier (IV-TF)

Para a análise do espectro do infravermelho, para cada amostra foram confeccionadas pastilhas com brometo de potássio (KBr), sendo obtido ainda o “branco” da análise, composto apenas por KBr. Para isso, foi utilizada uma prensa digital. A proporção, em %, entre as quantidades de amostra e KBr utilizada foi de 1:99.

Nessa etapa, as condições utilizadas (tempos e massa) foram aplicadas a todas as amostras, no entanto, previamente foram testados variações dos parâmetros utilizados e escolhidos os melhores. Assim, o tempo de compressão aplicado a todas as amostras foi de 5 minutos, a 30 T, que possibilitou a obtenção de pastilhas de baixa opacidade. As pastilhas foram armazenadas em dessecador, para evitar hidratação, sendo analisadas posteriormente.

3.7 Conversão (esterificação) e recuperação

O biocatalisador foi utilizado em reação de esterificação de ácido oleico com metanol, em reator Parr, a 100 rpm e temperatura de 30°C, durante 12 h, como teste para se avaliar o rendimento da enzima imobilizada. A capacidade de conversão dos biocatalisadores foi verificada através do cálculo da acidez do produto da esterificação, por titulação (solução de NaOH), feita com amostras com enzimas imobilizadas e o branco (sem biocatalisador).

Para a recuperação após a esterificação, a mistura contendo enzimas imobilizadas, reagentes e produtos foi centrifugada a 4000 rpm, por 5 min. A fase líquida foi coletada através de pipeta e levada diretamente para recipiente para se calcular a acidez. O sólido obtido foi lavado com tolueno e seco à temperatura ambiente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MCM-41

4.1.1 Caracterização

4.1.1.1 Fisissorção de N₂

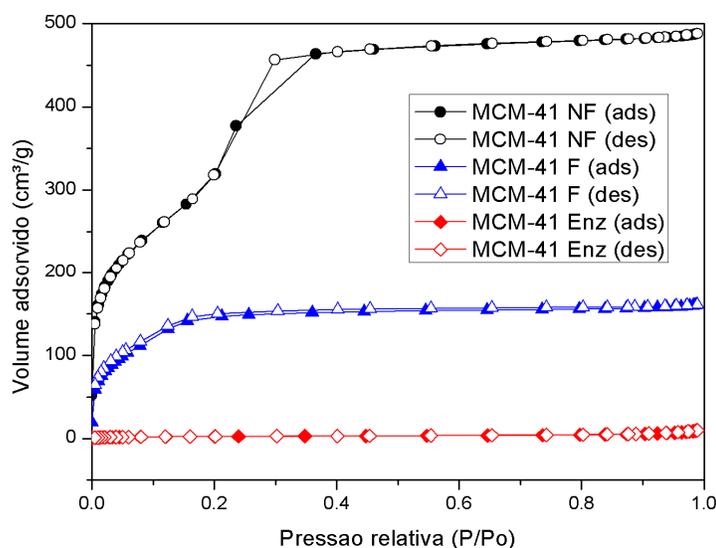


Figura 12 – Isotermas das amostras M41, M41-A e M41-AE.

As amostras do material não funcionalizado e funcionalizado apresentaram variação de tamanho de poro – T_p (Å), volume de poro – V_p (cm³/g) e área superficial – A_s (m²/g), as quais foram compatíveis com a literatura científica pesquisada e variaram conforme é mostrado na Tabela 4, com exceção de T_p que apresentou aumento na amostra funcionalizada. Todas as amostras MCM-41 apresentaram diminuição na A_s e o no V_p diminuíram devido ao ancoramento da amina na parede dos seus poros e a imobilização da enzima (Tabela 4).

Tabela 4 – Fisissorção de N₂.

Amostras	Fisissorção de N ₂		
	A_s - BET (m ² /g)	V_p - BJH (cm ³ /g)	T_p - BJH (nm)
M41	1311,0	0,870	2,7
M41-A	498,0	0,023	4,8
M41-AE	61,1	0,013	9,6

Inicialmente neste estudo, antes das análises Fisissorção de N₂, era esperada a diminuição dos parâmetros três parâmetros de superfície, em decorrência da ocupação de espaço pela amina e pela enzima, em cada etapa de funcionalização e de imobilização, contudo o que ocorreu foi um aumento do tamanho do poro. Considerando o resultado do DRX (descrito mais adiante), houve uma perda do arranjo hexagonal do MCM-41, assim, os dados obtidos da análise de Fisissorção de N₂ podem indicar justamente essa perda estrutural do suporte, ocasionando, talvez, um alargamento de poros.

O MCM-41 apresentou isotermas do tipo IV (GRÜN et al., 1999), que possui dois patamares, sendo que em um, a velocidade de adsorção e a dessorção de N₂ apenas diminui (mas volta a aumentar) e no outro patamar, ocorre saturação da superfície do material, como baixa taxa de adsorção do gás, durante o aumento da pressão (Figura 12).

4.1.1.2 Difração de Raios-X (DRX)

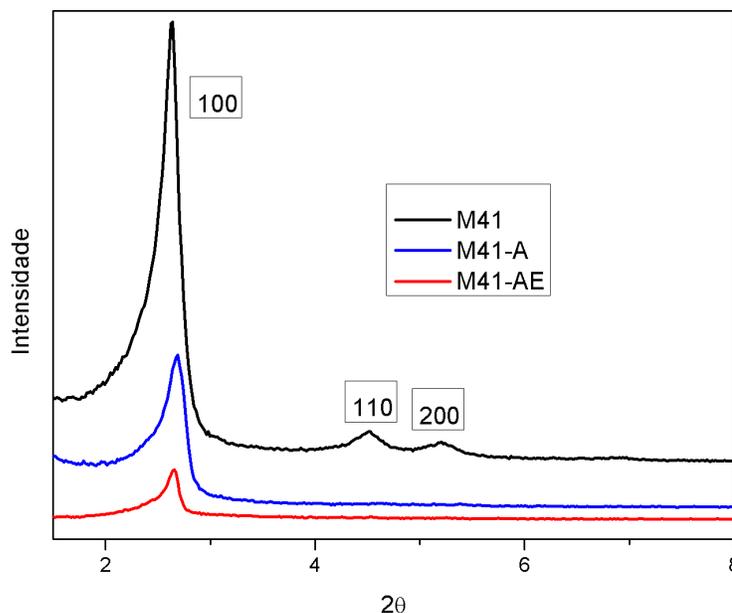


Figura 13 – Difratogramas das amostras M41, M41-A e M41-AE.

Para obtenção dos difratogramas, para o MCM-41, as análises foram feitas em baixo ângulo (2θ), entre, aproximadamente, 1° e 8° .

A partir do resultado das análises, como pode ser observado na Figura 13, foram encontrados três picos (100), (110) e (200) de Bragg entre os ângulos de $2,5^\circ$ e $5,5^\circ$, indicando presença de estrutura hexagonal característica do MCM-41 (sem funcionalização e imobilização), como observado por GRÜN et al., (1999), que também utilizou CTAB e observou que o surfactante utilizado na síntese de MCM-41 influencia os resultados de DRX, podendo havendo ocorrência de um quarto pico, de baixa intensidade.

Para distância interplanar (d_{100}) ou *d-spacing*, que corresponde à distância entre o centro dos poros para a estrutura hexagonal do MCM-41, foi obtido o valor de 3,46 nm, através de DRX, a qual poderia ser obtida através da equação 1.

$$d_{100} = \frac{\lambda}{\sin} \quad (\text{equação 1})$$

Na estrutura do MCM-41, para o parâmetro de célula (a_0), para dois poros contíguos, foi obtida a distância de 3,99 nm, a partir da equação 2, abaixo (Figura 13).

$$a_0 = \frac{2d_{100}}{\sqrt{3}} \quad (\text{equação 2})$$

Assumindo-se a espessura de 1 nm (10 Å) da parede dos poros, de acordo com estudo de Ortlam et al. (1996), o tamanho do poro (Tp) da amostra M41 sintetizado neste estudo apresentou 2,99 nm, que foi semelhante ao valor obtido por Fisissorção de N_2 , que foi 2,7 nm.

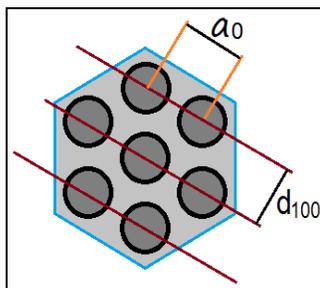


Figura 14 – Estrutura hexagonal do MCM-41 (d_{100} e a_0).

As amostras funcionalizadas (M41-A) e com enzima imobilizada (M41-AE) também foram submetidas ao DRX. Entre o M41 e M41-A, foi observada uma diminuição drástica do pico (100) e o completo desaparecimento dos demais, indicando a ligação do APTES nos poros do MCM-41 causou desordem no arranjo hexagonal do material (BLASCO-JIMÉNEZA et al., 2010). Em M41-AE, a presença da enzima ancorada também afetou a estrutura do suporte, pois houve uma diminuição de intensidade após imobilização da enzima. Na Figura 14, estão os difratogramas das amostras M41, M41-A e M41-AE, ressaltando-se que a última foi feita em triplicata na imobilização da enzima, estando presente na figura apenas uma das replicatas obtidas (em vermelho).

4.1.1.3 Espectrometria de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV-TF)

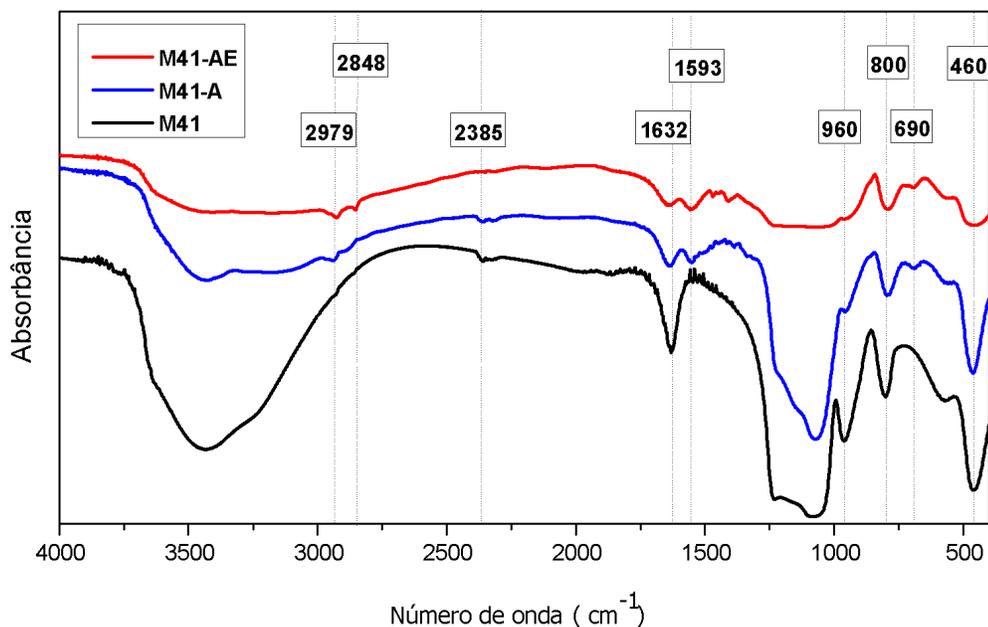


Figura 15 – IV-TF das amostras M41, M4-A e M41-AE.

Os resultados obtidos são semelhantes aos observados na literatura científica, não somente a estudos sobre MCMs, mas também a SBA-15, que também é um material mesoporoso.

As amostras M41, M41-A e M41-AE analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) apresentaram variação de bandas, devido às modificações que o suporte sofreu durante as etapas de funcionalização e imobilização das enzimas.

Abanda observada em 460 cm⁻¹ corresponde à vibração de flexão de Si–O–Si (que forma a estrutura interna das paredes nos poros), a qual não sofreu alteração nas amostras funcionalizadas, assim como observado por Wang et al., (2012). Contudo, houve alteração da absorbância dessa banda nas amostras com enzima ancorada, indicando alguma perda da estrutura hexagonal do MCM-41 (Figura 15).

Uma banda que foi bem evidente e que não sofreu qualquer alteração nas amostras analisadas foi 800 cm⁻¹, que foi atribuída à vibração de estiramento simétrico de Si–O. Também foi identificada a banda 960 cm⁻¹, referente à vibração de estiramento de Si–OH (silanol) (WANG et al., 2012), que forma a superfície das paredes dos poros (CAI et al., 1999; HU et al., 2012), cuja baixa intensidade em M41-

A e M41-AE indica modificação do silanol, em decorrência da ligação APTES – MCM-41, através da hidroxila (XU et al., 2011).

Foram identificadas bandas entre 2900 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} que correspondem vibração de alongamento de C–H, como citado por Ma et al., (2004). Assim, em M41-A a banda 2979 cm^{-1} indica a presença de C–H, como pode também ser evidenciado através do trabalho realizado por Szegedi et al. (2011), atribuindo-se essa banda à presença de APTES ancorado. Além dessa banda, a de 690 cm^{-1} corrobora com essa indicação, pois corresponde à vibração de dobramento de N–H (SHI et al., 2009), assim como a banda 1593 cm^{-1} que, de acordo com Blasco et al. (2010), corresponde ao NH_2 da amina.

Quanto ao intervalo acima mencionado entre 2900 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , referente ao C–H, na amostra M41-AE foi identificada a banda 2848 cm^{-1} (inexistente em M41-A), que pode corresponder à estrutura molecular das enzimas imobilizadas, provavelmente, devido às cadeias laterais de alguns aminoácidos.

A banda larga identificada entre 1000 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} corresponde à vibração de alongamento (estiramento) de Si–O–Si, cuja intensidade variou na amostra funcionalizada possivelmente devido ao mesmo tipo de vibração causado por C–N e Si–CH₂–R, que podem ocorrer em intervalos de $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ e $1200\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (SHI et al., 2009).

4.1.2 Espectrofotometria de UV – Imobilização

Tabela 5 – Variação de absorbância

AMOSTRA	Variação absorbância por hora				
	0h	1h	2h	3h	4h
Enzima	0,0655 (100%)	0,0692 (100%)	0,0624 (100%)	0,0529 (100%)	0,0512 (100%)
M41-A + enzima	0,0515 (78,62%)	0,0317 (45,80%)	0,0014 (2,24%)	0,0119 (22,49%)	0,0087 (16,99%)
Branco	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00

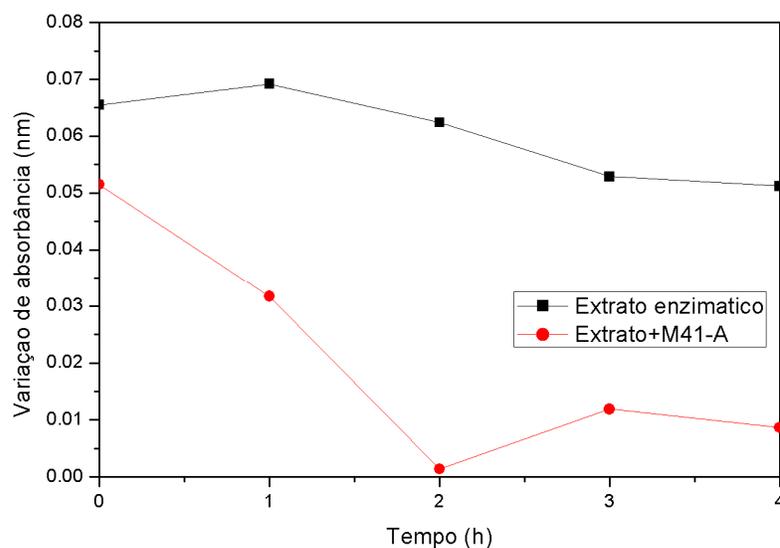


Figura 16 – Variação de absorvância

Durante as análises, a amostra contendo apenas extrato enzimático variou entre 0,069 nm e 0,051 nm no decorrer de 4 horas, como pode ser observado na Tabela 5 e na Figura 16. A amostra contendo o extrato enzimático e M41-A apresentou grande variação de absorvância nas duas primeiras horas, chegando até próximo da absorvância do branco, mas que tendeu a estabilizar em valor maior, após 4 h.

O aumento da absorvância ao final de 4 h pode ter sido influenciado pela centrifugação executada antes de cada medição no espectrofotômetro, provavelmente, devido à perda estrutural do MCM-41, que foi apontada nos resultados obtidos na caracterização de M41-A e M41-AE.

Tabela 6 – Variação de absorvância (duplicata)

AMOSTRA	Variação absorvância por hora				
	0h	1h	2h	3h	4h
Enzima	0,0460 (100%)	0,0635 (100%)	0,0624 (100%)	0,0529 (100%)	0,0512 (100%)
M41-A + enzima	0,0015 (3,26%)	0,0100 (15,74%)	0,0070 (12,0689%)	0,0085 (16,3461%)	0,0102 (20,731%)
Branco	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00

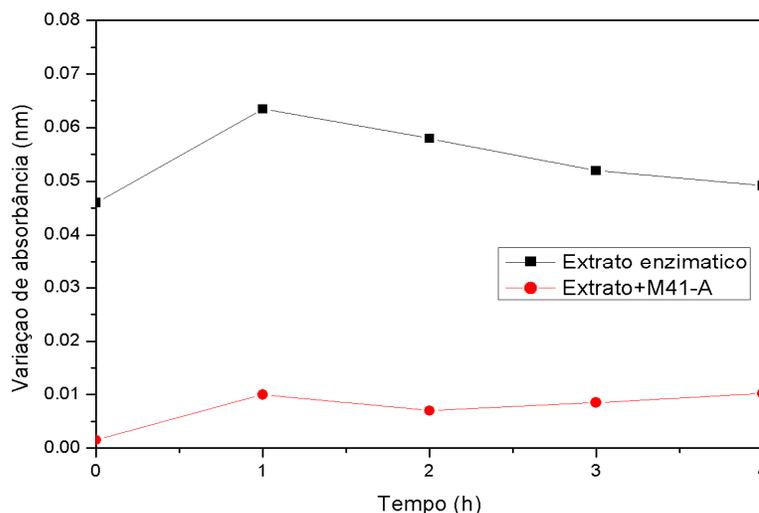


Figura 17 – Variação de absorbância (duplicata)

Na Tabela 6 e na Figura 17, os valores correspondem à duplicata da amostra, qual apresentou rápida diminuição da absorbância, chegando até 3,26% na primeira medição, indicando interação imediata do suporte funcionalizado com as enzimas do extrato. Contudo, houve aumento de absorbância, assim como na amostra anterior, demonstrando tendência estabilização da variação em torno de 20%, semelhante à amostra anterior.

4.1.3 Esterificação e conversão: enzima suportada em MCM-41

Na reação de esterificação do ácido oléico com metanol, o índice de acidez foi medido e obteve-se uma conversão de 52% da massa de ácido em éster, apontando que a enzima imobilizada apresentou atividade catalítica. Assim, a imobilização da lipase em MCM-41 modificado com APTES mostrou-se eficaz.

A imobilização, por ligação covalente, tem a vantagem de diminuir a perda da enzima da estrutura durante ciclos de reação, no entanto, alguns fatores podem influenciar a atividade, como a ligação ao suporte pode ocorrer através de resíduos de aminoácidos mais reativos, os quais normalmente fazem parte do sítio catalítico da enzima, interferindo na atividade catalítica da enzima, com abordado em estudo publicado por Rao et al. (1998). Apesar dessa possibilidade, as lipases imobilizadas

A partir desse resultado, futuros estudos visando diminuir a perda da estrutura hexagonal da MCM-41, melhorar a capacidade de conversão da enzima imobilizada em MCM-41 funcionalizado com aminas, como o APTES, podendo ser utilizados outros materiais mesoporosos como suportes, com estrutura formada por sílica, como outros representantes da mesma família do MCM-41 e o SBA-15.

4.2 Metacaulim (rejeito)

4.2.1 Caracterização

4.2.1.1 Fisissorção de N₂

Tabela 7 – Fisissorção de N₂, para metacaulim do rejeito.

Amostras	Fisissorção de N ₂		
	As - BET (m ² /g)	V _p - BJH (cm ³ /g)	T _p - BJH (nm)
MC	11,35	0,057	36,1
MC-A	10,63	0,055	41,3
MC-AE	11,69	0,013	25,0

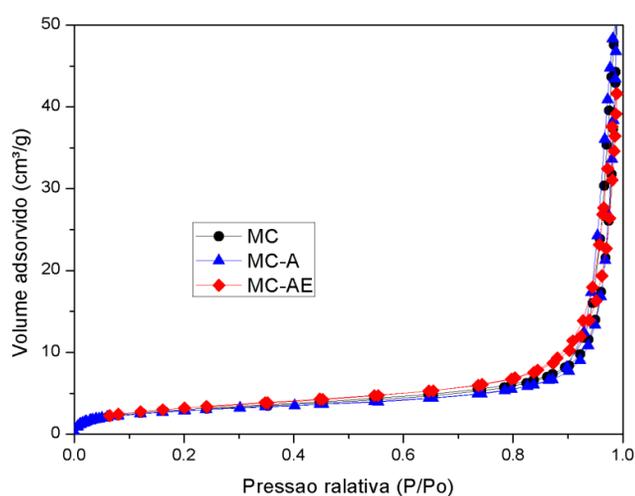


Figura 18 – Isotermas das amostras MC, MC-A e MC-AE.

As amostras do material não funcionalizado e funcionalizado apresentaram pouca variação de tamanho de poro – T_p (nm), volume de poro – V_p (cm³/g) e área superficial – A_s (m²/g), conforme é mostrado na Tabela 7.

Através desse método de análise, foi observado que o metacaulim obtido a 650 °C apresentou valores baixos de volume de poro e área superficial, no entanto, apresentou tamanho de poro maior que o observado no MCM-41. No entanto, deve-se destacar que a organização estrutural do metacaulim é bem diferente do MCM-41, pois apresenta camadas que formam espaços que podem ter influenciado os resultados obtidos para o Tp .

Todas as amostras MCM-41 apresentaram diminuição na As e no Vp devido ao ancoramento da amina e à imobilização da enzima, com exceção da área superficial da amostra MC-AE, que aumentou. Assim como ocorreu para MCM-41, a amostra funcionalizada de metacaulim apresentou um aumento no tamanho do poro (Tp) na amostra funcionalizada (MC-A) indicando que o método de funcionalização tem forte influência na estrutura da parede dos poros.

Apesar de ter ocorrido variação nos parâmetros analisado através da Fisissorção de N_2 , não houve alteração significativa que pudesse indicar que a funcionalização e a imobilização ocorreram de forma eficiente. Tal situação está atestada nas isotermas (tipo III) mostradas na Figura 18, através do qual se pode observar que não houve variação significativa na quantidade de N_2 adsorvida nas amostras MC, MC-A e MC-AE, durante a análise.

4.2.1.2 Difração de Raios-X (DRX)

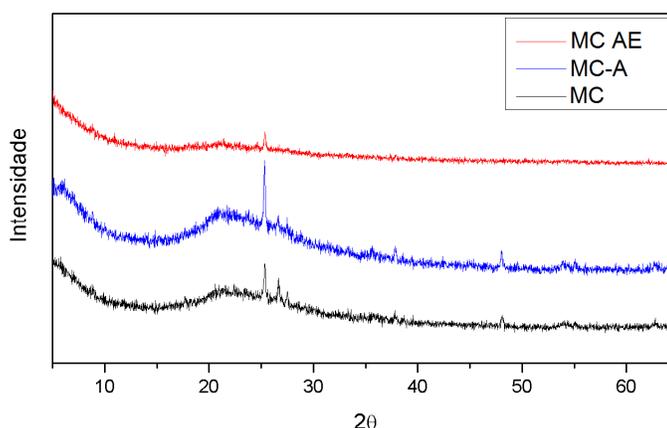


Figura 19 – Difratogramas das amostras MC, MC-A e MC-AE.

O metacaulim obtido a 650°C, comparando com o caulim (CARNEIRO et al., 2003), apresenta uma quantidade muito menor de picos, sendo Comparando os difratogramas obtidos para as amostras MC, MC-A e MC-AE (Figura 19) e o

encontrado na literatura científica pesquisada, foi observada grande diminuição no padrão de picos. No entanto, a ausência de muitos picos pode ser explicada devido à mudança de fase da caulinita em metacaulinita, com perda de $-OH$, das camadas de octaedros e tetraedros, durante a calcinação do material.

4.2.1.3 Espectroscopia de Infravermelho-Transformada de Fourier (IV-TF)

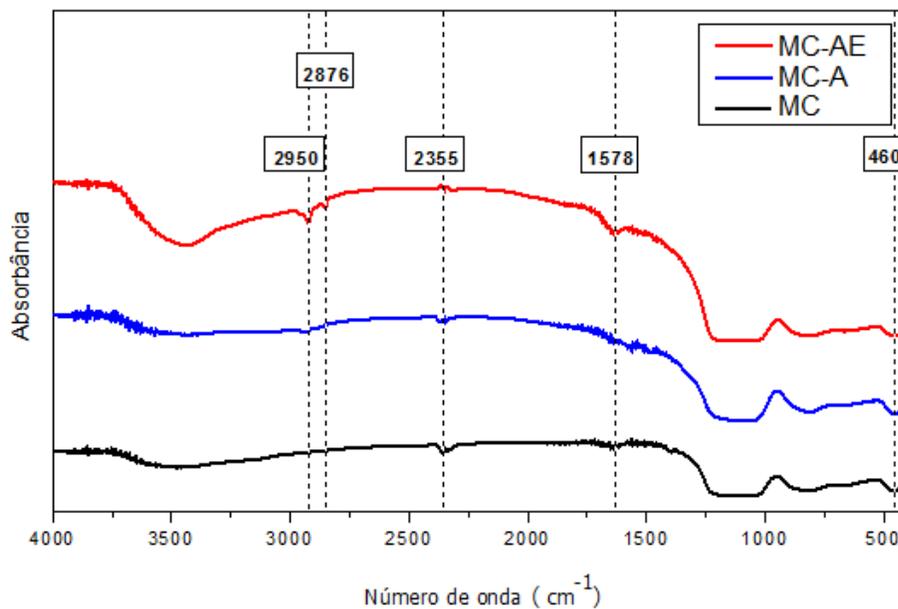


Figura 20 – IV-TF das amostras MC, MC-A e MC-AE

Através desse método foram observadas bandas que apontam que a funcionalização e o ancoramento de enzimas ocorrem no metacaulim. Na Figura 20, estão mostrados os espectros formados das amostras MC, MC-A e MC-AE, que se assemelham ao obtido para o MCM-41 (anteriormente descrito).

Entre as semelhanças, destaca-se que identificadas bandas no intervalo entre 2900 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , onde foi encontrada a banda 2950 cm^{-1} , na amostra funcionalizada, que, considerando Ma et al. (2004), corresponde à vibração de alongamento de C–H, associado à presença do APTES. Nesse intervalo, somente na amostra com enzima imobilizada, foi encontrada a banda 2876 cm^{-1} , a qual pode estar relacionada ao C–H dos aminoácidos da cadeia lateral da molécula. Outra banda encontrada somente no metacaulim com enzima imobilizada foi a 1578 cm^{-1} ,

que ocorreu próximo à banda atribuída à enzima ligada ao MCM-41, como anteriormente discutido neste trabalho, no item 4.1.1.3 (Figura 15).

4.2.2 Espectrofotometria de UV – Imobilização

Tabela 8 – Variação de absorvância

AMOSTRA	Variação absorvância por hora				
	0h	1h	2h	3h	4h
Enzima	0,0655 (100%)	0,0692 (100%)	0,0624 (100%)	0,0529 (100%)	0,0512 (100%)
MC-A + enzima	0,0280 (42,74%)	0,0467 (67,48%)	0,1034 (165,70%)	0,0909 (171,83%)	0,1362 (266,01%)
Branco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

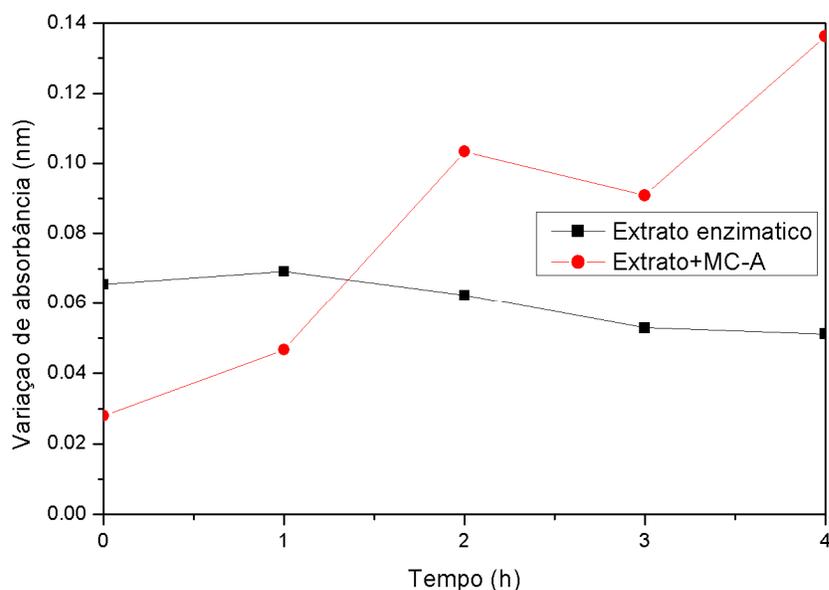


Figura 21 – Variação de absorvância

Na Tabela 8 e na Figura 21, estão indicadas as variações de absorvância de amostra de metacaulim funcionalizado em extrato enzimático. No tempo “0”, inicialmente houve alta diminuição na absorvância, em comparação ao resultado de amostras contendo apenas o extrato enzimático. No entanto, no decorrer de 4h, a

variação de absorvância ultrapassou os valores obtidos para o extrato enzimático, indicando que as enzimas não permaneceram ligadas ao metacaulim de forma satisfatória. Assim, a utilização do metacaulim como suporte não foi satisfatória.

Tabela 9 – Variação de absorvância (duplicata)

AMOSTRA	Variação absorvância por hora				
	0h	1h	2h	3h	4h
Enzima	0,0460 (100%)	0,0635 (100%)	0,0624 (100%)	0,0529 (100%)	0,0512 (100%)
MC-A + enzima	0,02 (43,478%)	0,0495 (77,952%)	0,0695 (199,82%)	0,0635 (122,155%)	0,0837 (170,121%)
Branco	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00

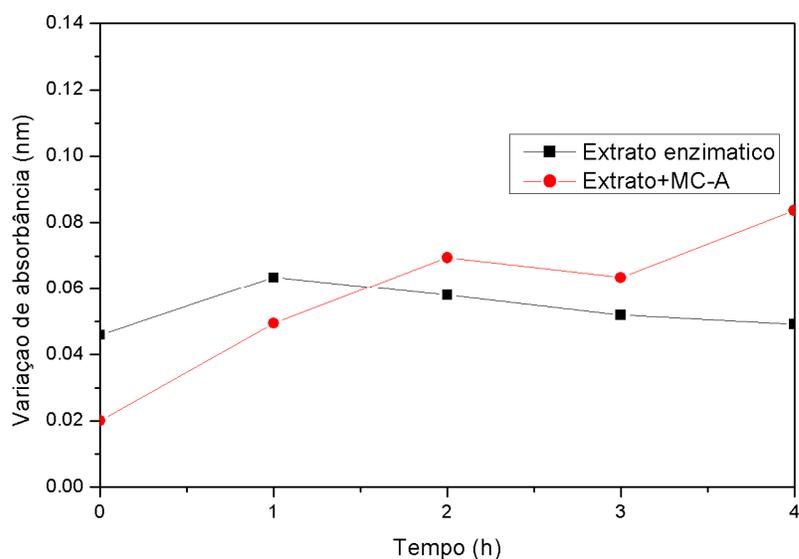


Figura 22 – Variação de absorvância (duplicata)

Durante os procedimentos de imobilização das enzimas, as amostras não apresentaram as absorvâncias identificadas não apresentaram resultados satisfatórios, pois no decorrer dos mesmos procedimentos aplicados para MCM-41, houve um aumento da absorvância no decorrer do procedimento de imobilização. Esse fato indicou que as enzimas, possivelmente, não tenham se ligado ao suporte

de forma eficiente e, com a ação da centrifugação, a pouca enzima que havia se ligado pode ter se perdido da superfície da material. Tal fato corrobora com os resultados obtidos por Fisissorção de N_2 e DRX, que também apontam que a enzima não foi bem imobilizada em metacaulim.

Esses resultados indicaram que o catalisador heterogêneo não foi bem formado a partir do metacaulim e com isso, o presente estudo seguiu as atividades voltadas ao biocatalisador imobilizado em MCM-41, que apresentou resultados mais interessantes.

4.2.3 Esterificação e conversão: enzima suportada em metacaulim

Devido aos resultados da caracterização, por Fisissorção de N_2 , DRX e de espectrofotometria, as amostras de MC-AE não apresentaram resultados satisfatórios e assim não houve a etapa de esterificação para essa amostra.

5 CONCLUSÕES

A análise por Fisissorção de N_2 apontou um aumento no tamanho de poro não esperado nas amostras funcionalizadas, cuja causa pode ter sido a perda da organização estrutural do MCM-41, na funcionalização e na imobilização. No caso do metacaulim, houve aumento do tamanho do poro, pouco significativo, e somente na funcionalização, enquanto que na imobilização de enzimas, ocorreu uma diminuição do diâmetro. No entanto, no caso do metacaulim, as isotermas indicam que após as etapas de funcionalização e imobilização não houve modificação significativa na superfície, que corrobora como a pouca variação nos propriedades de superfície (Tp , As e Vp).

Os resultados de DRX indicam que o MCM-41 sintetizado apresentou estrutura hexagonal, contudo, após funcionalização e imobilização, houve colapso parcial dessa organização, pois ocorreu diminuição significativa da intensidade do pico (100).

A análise de IV-TF provou que o APTES foi incorporado ao MCM-41, ligando-se covalentemente à estrutura do suporte, pois foram identificadas as bandas 2979 cm^{-1} e 690 cm^{-1} referentes, respectivamente, ao tipo de vibração de C–H e de N–H, e, principalmente, pela interferência ocorrida na banda 960 cm^{-1} referente ao silanol, indicando ligação da anima à hidroxila (–OH) da superfície do material.

Os resultados das análises de espectrometria de UV indicaram que as enzimas se ligaram rapidamente no MCM-41 funcionalizado, havendo posterior tendência a estabilização das absorbâncias em até 4 h, após início da imobilização. Contudo, apesar de ter ocorrido, inicialmente, provável ligação das enzimas ao metacaulim funcionalizado, após as duas primeiras horas houve aumento considerável da absorbância e cada amostra, indicando que a ancoragem das enzimas não foi eficaz, no decorrer de 4h.

A conversão obtida através do biocatalisador foi de 52% da massa de ácido em éster, indicando que há viabilidade quanto à utilização do MCM-41, funcionalizado com amina, para a imobilização de lipase, pois sua atividade catalítica foi preservada.

O metacaulim não apresentou resultados satisfatórios como suporte, contudo, seu uso para esse fim pode ser viabilizado no futuro, a partir da continuidade dos estudos visando possíveis modificações na superfície do metacaulim, os quais estão sendo atualmente realizados através do tratamento prévio do metacaulim com solução de reagentes, tais como o NaOH e o HCl, no LCO/UFPA. Assim, dentre outras coisas, o presente estudo proporcionou um ponto de partida, a partir do qual outras pesquisas poderão ser feitas, visando alternativas quanto à aplicação eficaz do metacaulim (do rejeito), funcionalizado ou não, como suporte de enzimas.

REFERÊNCIAS

- ATHENS, G. L.; SHAYIB, R. M.; CHMELKA, B. F. **Functionalization of mesostructured inorganic–organic and porous inorganic materials**. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14 (2009) 281–292.
- BAI, W.; YANG, Y.-J.; TAO, X.; CHEN, J.-F.; TAN, T.-W. **Immobilization of lipase on aminopropyl-grafted mesoporous silica nanotubes for the resolution of (R, S)-1-phenylethanol**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76 (2012) 82– 88.
- BARBOSA, M. N. **Síntese, caracterização e aplicação de MCM-41 funcionalizado com di-isopropilamina no processo de adsorção do dióxido de carbono**. 2009. Dissertação. (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2009).
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; LAFUENTE, R. F. **Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica***. *Process Biochemistry* 47 (2012) 1220–1227.
- BECK, J. S.; VARTULI, J. C.; ROTH, W. J.; LEONOWICZ, M. E.; KRESGE, C. T.; SCHMITT, K. D.; CHU, C. T.-W.; OLSON, D. H.; SHEPPARD, E. W.; McCULLEN, S. B.; HIGGINS, J. B.; SCHLENKERT, J. L. **A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates**. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 114, No. 27, 1992.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Guanabara-Coogan. 5ª Ed. p, 625. Rio de Janeiro, 2004.
- BLASCO-JIMÉNEZA, D.; SOBCZAK, I.; ZIOLEKB, M.; LÓPEZ-PEINADO, A. J., MARTÍN-ARANDA, R. M. **Amino-grafted metallosilicate MCM-41 materials as basic catalysts for eco-friendly processes**. *Catalysis Today* 152 (2010) 119–125.
- CAI, Q.; LIN, W. Y.; XIAO, F. S.; PANG, W. Q.; CHEN, X. H.; ZOU, B. S. **The preparation of highly ordered MCM-41 with extremely low surfactant concentration**. *Microporous and Mesoporous Materials* 32 (1999) 1–15.
- CAMPANATI, M.; FORNASARI, G.; VACCARI, A. **Fundamentals in the preparation of heterogeneous catalysts**. *Catalysis. Today* 77 (2003) 299–314.
- CARNEIRO, B. S.; ANGÉLICA, R. S.; SCHELLER, T.; de CASTRO, E. A. S.; NEVES, R. F. **Caracterização mineralógica e geoquímica e estudo das transformações de fase do caulim duro da região do Rio Capim, Pará**. *Cerâmica* 49 (2003) 237-244.
- CASTRO, HEIZIR F.; MENDES, ADRIANO. A. e SANTOS, JÚLIO C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 1, 146-156, 2004.

CRUZ, J. C.; PFROMM, P. H.; REZAC, M. E. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on fumed silica**. Process Biochemistry 44 (2009) 62–69.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. **Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase**. Biochimica et Biophysica Acta 1441 (1999) 205–214.

DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. **Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from Triglycerides**. Energy Environ. Sci., 2009, 2, 1258–1265.

EL-NAGGAR, M. R. **Applicability of alkali activated slag-seeded Egyptian Sinai kaolin for the immobilization of 60-Co radionuclide**. Journal of Nuclear Materials 447 (2014) 15–21.

GITLESEN, THOMAS; BAUER, MICHAEL; ADLERCREUTZ, PATRICK. **Adsorption of lipase on polypropylene powder**. Biochimica et Biophysica Acta 1345 _1997. 188–196.

GRÜN, MICHAEL; UNGER, K. KLAUS; MATSBUMOTO, AKIHIKO; TSUTSUMI, KAZUO. **Novel pathways for the preparation of mesoporous MCM-41 materials: control of porosity and morphology**. Microporous and Mesoporous Materials 27 (1999) 207–216.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins: An Already Solved Problem or Still an Exciting Challenge? Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells**. Second Edition. 2006. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. **Lipid Biochemistry¹ Lipids: definition, isolation, separation and Detection**. 5^a Ed., 2002. Cap 1. ISBN 0-632-05409-3.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology 39 (2006) 235–251.

HEAH, C. Y.; KAMARUDIN, H.; AL BAKRI A. M. Mustafa; BNHUSSAIN, M.; LUQMAN, M.; NIZAR, I. Khairul; RUZAIDI, C. M.; LIEW, Y. M. **Study on solids-to-liquid and alkaline activator ratios on kaolin-based geopolymers**. Construction and Building Materials 35 (2012) 912–922.

HU, ZUNFANG; XU, LONGQIAN; WEN, XIANGHUA. **Mesoporous silicas synthesis and application for lignin peroxidase immobilization by covalent binding method**. Journal of Environmental Sciences 2012, 25(1) 181–187.

JAEGER, K-E; EGGERT, T. **Lipases for biotechnology**. Current Opinion in Biotechnology. 2002, 13:390–397.

JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology**. Tibtech, vol. 16, p. 396–403, 1998.

KAKALI, G.; PERRAKI, T.; TSIVILIS, S.; BADOGIANNIS, E.. **Thermal treatment of kaolin: the effect of mineralogy on the pozzolanic activity**. Applied Clay Science 20 2001 73–80.

KATCHALSKI-KATZIR, E.. **Immobilized enzymes - learning from past successes and failures**. Elsevier Science Publishers Ltd (UK). VOL 11. (1993) 471-478.

LI, Q.; FAN, F.; WANG, Y.; FENG, W.; JI, P. **Enzyme immobilization on carboxyl-functionalized graphene oxide for catalysis in organic solvent**. Ind. Eng. Chem. Res. 2013, 52, 6343–6348.

MA, H.; HE, J.; EVANS, D. G.; DUAN, X. **Immobilization of lipase in a mesoporous reactor based on MCM-41**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 30 (2004) 209–217.

MACHADO, J. I. S. **Acetoxilação de α -Pineno com catalisadores heterogêneos**. 2010. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Monte de Caparica. 2010.

MARTELLI, M. C. **Transformações térmicas e propriedades cerâmicas de resíduos de caulins da região do rio Capim e do rio Jari – Brasil**. 2006. Tese. (Doutorado. Centro de Geociências). UFPA. 2006.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MURZIN, A. G.; BRENNER, S. E.; HUBBARD, T.; CHOTHIA, C. **SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures**. J. Mol. Biol. (1995) 247, 536–540.

NASCIMENTO, L. A. S.; ANGÉLICA, R. S.; COSTA, C. E. F.; ZAMIAN, J. R.; ROCHA FILHO, G. N. **Conversion of waste produced by the deodorization of palm oil as feedstock for the production of biodiesel using a catalyst prepared from waste material**. Bioresource Technology 102 (2011) 8314–8317(a).

NASCIMENTO, L. A. S.; TITO, L. M. Z.; ANGÉLICA, R. S.; COSTA, C. E. F.; ZAMIAN, J. R.; ROCHA FILHO, G. N. **Esterification of oleic acid over solid acid catalysts prepared from Amazon flint kaolin**. Applied Catalysis B: Environmental 101 (2011) 495–503(b).

NASCIMENTO, L. A. S.; ANGÉLICA, R. S.; COSTA, C. E. F.; ZAMIAN, J. R.; ROCHA FILHO, G. N. **Comparative study between catalysts for esterification prepared from kaolins**. Applied Clay Science 51 (2011) 267–273(c).

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 5^o Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. **Adsorption of invertase**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, 38 (5), pp 1109–1115.

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. **Estudo da Influência do Solvente, Carboidrato e Ácido Graxo na Síntese Enzimática de Ésteres de Açúcares**. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 5, 792–796, 2005.

PETERSEN, M. T. N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. **How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution**. *Journal of Biotechnology*. 85 (2001) 115–147.

QIU, X.; LEI, X.; ALSHAMERI, A.; WANG, H.; YAN, C. **Comparison of the physicochemical properties and mineralogy of Chinese (Beihai) and Brazilian kaolin**. *Ceramics International* 40 (2014) 5397–5405.

RAO, S. V.; ANDERSON, K. W.; BACHAS, L. G. **Oriented Immobilization of Proteins**. *Mikrochim. Acta* 128, 127–143 (1998).

RODRIGUES, R. S. B. **Produção e caracterização de um biocatalisador heterogêneo para ser utilizado em aplicações industriais**. 2009. Tese. (Doutorado em biologia celular e molecular) – Centro de Tecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul (RS). 2009.

SANTOS, E.; SCORZELLI, R. B.; BERTOLINO, L. C.; ALVES, O.C.; MUNAYCO, P. **Characterization of kaolin from the Capim River region — Brazil**. *Applied Clay Science* 55 (2012) 164–167.

SCHUMACHER, K., UNGER, M. G. K. K. **Novel synthesis of spherical MCM-48. Microporous and Mesoporous Materials**. 27 (1999) 201–206.

SHAH, P.; SRIDEVI, N.; PRABHUNE, A.; RAMASWAMY, V. **Structural features of Penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15**. *Microporous and Mesoporous Materials* 116 (2008) 157–165.

SHI, B.; WANG, Y.; GUO, Y.; WANG, Y.; WANG, Y.; GUO, Y.; ZHANG, Z.; LIU, X. LU, G. **Aminopropyl-functionalized silicas synthesized by W/O micro emulsion for immobilization of penicillin G acylase**. *Catalysis Today* 148 (2009) 184–188.

SRIVASTAVA, R.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. **Sites for CO₂ activation over amine-functionalized mesoporous Ti(Al)-SBA-15 catalysts**. *Microporous and Mesoporous Materials* 90 (2006) 314–326

SZEGEDI, A.; POPOVA, M.; GOSHEV, I.; MIHÁLY, J. **Effect of amine functionalization of spherical MCM-41 and SBA-15 on controlled drug release**. *Journal of Solid State Chemistry* 184 (2011) 1201–1207.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. **Immobilized Enzymes: Methods and Applications**. *Topics in Current Chemistry*, Vol. 200. 1999. 95–126.

XU, Y-Q; ZHOU, G-W; WU, C-C; LI, T-D; SONG, H-B. **Improving adsorption and activation of the lipase immobilized in amino-functionalized ordered mesoporous SBA-15**. *Solid State Sciences* 13 (2011) 867–874.

WANG, C. F.; ZHOU, G. W.; LI, Y. J.; LU, N., SONG, H. B.; ZHANG, L. **Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica**. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 406 (2012) 75– 83.

WEN, Z.; YU, X.; TU, S-T; YAN, J.; DAHLQUIST, E. **Biodiesel production from waste cooking oil catalyzed by TiO₂–MgO mixed oxides**. *Bioresource Technology* 101 (2010) 9570–9576.

ZHANG, J.; ZHANG, F.; YANG, H.; HUANG, X.; LIU, H.; ZHANG, J.; GUO, S. **Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization**. *Langmuir* (2010), 26(9), 6083–6085.

ZHANG, X.; LIN, S.; LU, X-Q; CHEN, Z-L. **Removal of Pb(II) from water using synthesized kaolin supported nanoscale zero-valent iron**. *Chemical Engineering Journal* 163 (2010) 243–248.