

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/10/2016.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Alex Henrique Miller

“Estudos experimentais e teórico-computacionais de novos complexos nanozeólitas-enzimas empregados na produção de biocombustíveis.”

São José do Rio Preto

2016

Alex Henrique Miller

“Estudos experimentais e teórico-computacionais de novos complexos nanozeólitas-enzimas empregados na produção de biocombustíveis.”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto

2016

Miller, Alex Henrique.

Estudos experimentais e teórico-computacionais de novos complexos nanozeólitas-enzimas empregados na produção de biocombustíveis / Alex Henrique Miller. -- São José do Rio Preto, 2016

108 f. : il., tabs.

Orientador: José Geraldo Nery

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Zeólitos. 4. Enzimas.
5. Lipase. 6. Biocombustíveis. 7. Bioinformática. I. Nery, José Geraldo.
II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Alex Henrique Miller

“Estudos experimentais e teórico-computacionais de novos complexos nanozeólitas-enzimas empregados na produção de biocombustíveis.”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP- São José do Rio Preto- SP

Profa. Dra. Eleni Gomes
UNESP - São José do Rio Preto- SP

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
UNIFAL- Alfenas- MG

São José do Rio Preto
29 de abril de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe (*in memoriam*)

Marlene Aparecida dos Santos Miller

e a meu pai

Orival Miller

por quem cheguei até aqui, e por quem quero ir muito além.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais pela sólida formação de conduta que me proveram, permitindo ser quem sou e lutar pelo que sonho a minha maneira.

Às minhas irmãs e sobrinhos por serem a melhor família que eu poderia ter, e estarem sempre ao meu lado.

À Solange pelos anos de convivência, e por toda ajuda dada desde o início da amizade.

Aos meus amigos Janine, Carolina, Ingrid e Fernando, companheiros de Graduação, e agora de Pós-Graduação, por tudo vivido e compartilhado juntos.

A todos os professores que contribuíram com minha formação.

Aos meus companheiros de pesquisa no LACET, Adriano, Janine, Juliana, Danilo, Alex, Davi e Roberto, pelo companheirismo e por toda a ajuda que me foi dada em caráter profissional e não profissional ao decorrer do Mestrado.

Ao Dr. Fábio pela colaboração nos trabalhos teórico-computacionais.

Ao Prof. Dr. Leandro Martins do Instituto de Química de Araraquara pelas análises de cromatografia gasosa.

À Profa. Dra. Eleni Gomes, a Pós-doutoranda Ana Lúcia Ferrarezi e a Técnica Daniela Correa de Oliveira Lisboa do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada pela ajuda, e pelos recursos materiais fornecidos nos estudos em colaboração.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Geraldo Nery, por todo o trabalho dedicado, pelo fomento à minha pesquisa, por sanar minhas dúvidas, e contribuir efetivamente na minha formação científica.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

"There are mysteries to the universe we were never meant to solve. But who we are and why we are here, are not among them. Those answers we carry inside."

(Optimus Prime-Age Of Extinction)

RESUMO

A busca por fontes alternativas de energia e/ou a valorização das existentes (principalmente de caráter “limpo”) é tema amplamente discutido nos setores científicos e industriais, com ênfase aos processos catalíticos envolvidos na conversão de biomassa a biocombustíveis e/ou outros produtos de interesse de diversos setores industriais, e foi a base motivacional deste trabalho. O principal objetivo do presente trabalho foi a obtenção de biocatalisadores heterogêneos a partir da imobilização de lipases em nanozeólita faujasita (FAU) após troca iônica com o metal de transição Ni^{2+} , e o uso dos complexos nanozeólita-enzima em reações de transesterificação do óleo de Microalgas em ésteres etílicos (FAEEs). Inicialmente, foi sintetizada a nanozeólita FAU (NaX-Na^+), seguida da sua troca iônica com soluções de sulfato de níquel (0,5M) encubadas a 80°C por 3 dias (3D), formando o material denominado NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D). Os materiais obtidos tiveram suas estruturas cristalográficas confirmadas por Difração de Raios X (DRX). Após os experimentos de troca-iônica, os materiais foram utilizados para imobilização das lipases fungicas de *T. lanuginosus* (TLL), *R. miehei* (RML), *C. rugosa* (CRL) e de *C. antarctica* B (CALB), e foram denominados NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D)-TLL, Ni^{2+} (0,5M-3D)-RML, Ni^{2+} (0,5M-3D)-CRL e Ni^{2+} (0,5M-3D)-CALB respectivamente. As atividades lipolíticas desses complexos foram determinadas a partir da hidrólise de azeite de oliva emulsificado, sendo encontrados os valores de 850, 550, 425 e 50 U/g respectivamente. Objetivando-se a otimização da produção de ésteres etílicos, os complexos foram aplicados em reações de transesterificação do óleo de microalgas em várias condições experimentais. O uso de 5% m/m (massa de catalisador/massa óleo) do complexo com TLL apresentou conversão de 85% de ésteres etílicos (12h/35°C) após adição única de etanol na proporção molar de 1:4 (óleo:etanol), enquanto 5% m/m do complexo com RML obteve 52 % de conversão (12h/45°C) após adição em 4 etapas do volume de álcool (a cada duas horas), sendo as condições destes ensaios para estes dois complexos estabelecidas como condições ótimas para a reação. Os complexos com CRL e CALB apresentaram baixos rendimentos quando aplicados nas reações de transesterificação. Experimentalmente, foi observado apenas para o complexo Ni^{2+} (0,5M-3D)-RML um aumento significativo da estabilidade térmica no intervalo de 25 a 80°C. Os complexos NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D)-TLL, e Ni^{2+} (0,5M-3D)-CALB foram também estudados para a reação de esterificação de ácidos graxos livres. Em reações de esterificação (12h/45°C) de ácido oleico utilizando 5% m/m de complexo, na proporção molar 1:2 (ácido:etanol) produções de 89 e 83% de FAEEs foram obtidas para os complexos NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D)-TLL e Ni^{2+} (0,5M-3D)-CALB,

respectivamente. Ambos os complexos foram também aplicados nas reações de transesterificação/esterificação simultâneas de óleo de Macaúba com alto percentual de ácido graxos livres (56%) e índice de acidez de 112 mg KOH/g. Para 5% m/m de complexo, 67 e 52% de FAEs foram produzidos (12h/45°C), para adição única do volume de etanol na proporção 1:6 (óleo:álcool). O complexo Ni^{2+} (0,5M-3D)-CALB apesar de não atuar efetivamente nas reações de transesterificação do óleo de microalgas, apresentou bons resultados nas reações de esterificação do ácido oleico, e possivelmente de esterificação dos ácidos graxos livres presentes no óleo de macaúba, sendo essa enzima portanto qualificada como específica para esterificação no sistema estudado. Visando compreender os baixos rendimentos obtidos com as enzimas CRL e CALB nas reações de transesterificação quando comparadas com as lipases TLL e RML estudos teórico-computacionais foram realizados usando análises de modos normais e simulações de dinâmica molecular na presença de metanol. Para análise da abertura e exposição do sítio catalítico foram verificados os distanciamentos máximos entre carbonos betas presente nos resíduos Pro-74 (pertencente a *lid*) e Pro-443 para a CRL, e Ile-144 (pertencente a *lid*) e Leu-285 para a CALB, resultante das simulações em comparação com as distâncias encontradas em suas estruturas cristalográficas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB). Nas análises de modos normais, a distância entre Pro-74 e Pro-443 foi apenas 0,1 Å superior a esta distância na lipase em conformação fechada (3,8 Å). Após dinâmica molecular com metanol, uma distância máxima de 6,5 Å foi encontrada. A distância calculada é superior à respectiva distância verificada na estrutura em conformação fechada e aproximadamente 3 vezes inferior à distância de 21,6 Å verificada na estrutura cristalográfica em conformação aberta. Isto indica que o baixo potencial catalítico desta enzima quando aplicada experimentalmente estaria relacionado à restrição de seu sítio catalítico devido à abertura insuficiente de sua *lid*. Por outro lado, a simulação de dinâmica molecular para a lipase CALB, revelou uma abertura de 14,3 Å maior que o dobro da abertura verificada na sua estrutura em conformação aberta (6Å), o que em princípio pode ser atribuído a presença do solvente e está em concordância com as observações experimentais.

Palavras-chave: Nanozeólita. Lipase. Imobilização. Biocombustíveis. Bioinformática.

ABSTRACT

The attempt to find new sources of energy and/or the valorization of the existent (mainly those of “clean” sources) is an issue widely discussed at the scientific and industrial sectors, with emphasis to the catalytic processes involved in biomass conversion to biofuels and/or others products of industrial interest, motivated this work. The main goal of this work was the synthesis of heterogeneous biocatalysts by immobilization of several lipases onto nano sized faujasite zeolite (FAU) after transition metal Ni^{2+} ion exchange. These biocatalysts were used in the microalgae oil transesterification to fatty acid ethyl esters (FAEEs). At first, the nano sized zeolite FAU was synthesized (NaX-Na^+), then the product was ion exchanged with nickel sulfate solution (0,5M) incubated under 80°C for 3 days (3D), yielding the denominated NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D) support. The obtained materials had their crystallographic structures confirmed by X-Ray Diffraction. After the ion exchange experiments, the materials were used to the fungal lipases from *T. lanuginosus* (TLL), *R. miehei* (RML), *C. rugosa* (CRL) and *C. antarctica* B (CALB) immobilization, and the complexes denominated NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D)-TLL, Ni^{2+} (0,5M-3D)-RML, Ni^{2+} (0,5M-3D)-CRL and Ni^{2+} (0,5M-3D)-CALB respectively. The complexes’ activities were measured by the emulsified olive oil hydrolysis, its activities values being 850, 550, 425 e 50 U/g respectively. Aiming the FAEEs yielding optimization, the complexes were applied in the microalgae oil transesterification under several experimental conditions. Using 5% w/w (weight of catalyst/weight of oil) of the TLL’s complex 85% of FAEEs yield was achieved (12h/ 35°C) after one step ethanol addition in 1:4 molar ratio (oil:alcohol), while the RML’s complex yielded 52% (12h/ 45°C) after step-wise alcohol addition (every each 2 hours, total of 4 steps), and the assays conditions for these two complexes established as the reaction optimum conditions. The CRL and CALB complexes have shown low yield when applied in transesterification reactions. Experimentally it was observed for the RML’s complex a significantly thermal stability in the temperature range $25-80^\circ\text{C}$. The complexes NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D)-TLL and Ni^{2+} (0,5M-3D)-CALB were also studied for the free fatty acids esterification. Esterification reactions (12h/ 35°C) using 5 % w/w of complex at molar ratio 1:2 (acid:ethanol) 89 and 83% FAEEs yields were achieved for the complexes NaX-Ni^{2+} (0,5M-3D)-TLL and Ni^{2+} (0,5M-3D)-CALB, respectively. Both complexes were also applied to the Macaw Palm oil, containing high free fatty acids percentage (56%) and acid value of 112 mg KOH/g, by simultaneous transesterification/esterification reactions. Using 5% w/w of complex in each assay, 67 and 52% of FAEEs were yielded (12h/ 45°C), for single step ethanol volume addition in molar rate 1:6 (oil:alcohol). Despite Ni^{2+} (0,5M-3D)-

CALB complex no efficiency in the microalgae oil transesterification, it has shown great results in the oleic acid esterification, and probably esterified the free fatty acids present in the Macaw Palm oil, being the enzyme then qualified as specific to the esterification reaction in this system. Aiming to understand the low yields obtained for the complexes with CRL and CALB in the transesterification reactions when compared with the TLL and RML ones, theoretical-computational studies were run using normal modes analysis and molecular dynamics simulations using methanol as solvent. For the catalytic site openness measurement the distance between carbons atoms present in the amino acids residues Pro-74 (belonging to the lid) and Pro-443 for CRL, and Ile-144 (belonging to the lid) and Leu-285 for CALB were monitored in the simulations and compared with the distances found in the enzymes crystallographic opened and closed structures available at the Protein Data Bank (PDB). After normal modes analysis, the maximum distance between Pro-74 and Pro-443 was only 0,1 Å higher than this distance found in the CRL closed conformation (3,8 Å). Later, after molecular dynamics with methanol, a 6,5 Å maximum distance was verified, but even this distance being higher than the one found in the closed conformation, it is a lot lower than the one found in the opened structure (21,6 Å), what makes possible to attribute the low catalytic potential of this enzyme when experimentally applied to its catalytic site restriction due insufficient lid opening. In the other hands, the molecular dynamics simulations to the CALB lipase exhibited a bigger openness more than two folds (14,3 Å) the openness found in the opened lipase structure (6Å), which can in principle be assigned to the solvent presence, and agrees with experimental data.

Keywords: Nanozeolite. Lipase. Immobilization. Biofuels. Bioinformatics.

Lista de figuras

Figura 1: Equação geral para a transesterificação de triglicerídeos na presença de álcoois e catalisadores. Fonte: adaptado de MEHER <i>et al.</i> (2006) ¹¹	22
Figura 2: Reações mediadas por lipases. Adaptado de Singh & Mukhopadhyay (2012) ²⁴	25
Figura 3: Estrutura de quatro tipos de zeólitas (faujasitas X e Y; ZSM-12; ZSM-5 ou silicalita-1; Theta-1 ou ZSM-22) e seus respectivos sistemas microporosos e dimensões. Fonte: adaptado de Weitkamp (2000) ⁴⁴	27
Figura 4: Todos os produtos possíveis da clivagem de triglicerídeos por lipases 1,3 específicas, e os produtos obtidos da etapa de migração acil: triglicerídeos (TG), diglicerídeos (DG), monoglicerídeos (MG) e glicerol (G). Fonte: adaptado de Kapoor & Gupta (2012) ³²	34
Figura 5: Modelo cinético de ação de lipase para substrato insolúvel. Fonte: Adaptado de REIS <i>et al.</i> (2010) ⁸⁸	36
Figura 6: Possíveis rotas reacionais e produtos obtidos da reação de oxidação do glicerol. Fonte: adaptado de Zhou <i>et al.</i> (2008) ⁹²	38
Figura 7: Representação do sítio catalítico e esquema reacional da lacase de <i>Trametes hirsuta</i> . Fonte: Sosna <i>et al.</i> (2010) ¹⁰¹	40
Figura 8: Ciclo catalítico de oxidação de um sistema lacase-mediador. Fonte: Adaptado de Desai e Nityanand (2011) ¹⁰⁰	41
Figura 9: Possível mecanismo de oxidação do sistema lacase/TEMPO. Fonte: Adaptado de Fabbrini <i>et al.</i> (2002) ¹⁰³	42
Figura 10: Funcionalização química de superfície de silicatos por silanização com grupamentos aminosilanos e ativação com reagente espaçador glutaraldeído, para posterior imobilização enzimática via ligação covalente. Fonte: Cardoso <i>et al.</i> (2009) ¹²¹	50
Figura 11: Difratogramas de raios X para as amostras de Faujasita sintetizada (NaX-Na ⁺) e após troca iônica com soluções de sulfato de níquel 0,5M por diferentes tempos (16 horas, 2 dias, 3 dias, 5 dias e 7 dias).	60
Figura 12: Acompanhamento de reações de transesterificação do óleo de microalgas na presença de etanol catalisada pelos complexos NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-TLL, NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-RML e NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-CRL. Razão molar óleo: etanol de 1:4; temperatura de 40° C; agitação magnética de 300 rpm.	62
Figura 13: Obtenção de FAEs para os complexos NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-RML e NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-TLL em reações de transesterificação de 12 horas a 40°C variando-se as etapas de adições de álcool.....	64
Figura 14: Curva de determinação de temperatura ótima para produção de FAEs para os complexos enzimáticos em estudo: NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-TLL, NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-RML e NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D)-CRL. Razões molares óleo: etanol 1:4 para os dois primeiros e 1:1 para o terceiro. Adição única de álcool para os complexos com TLL e CRL e em etapas para RML (0, 2, 4 e 6 horas).	65

Figura 15: Aplicação dos complexos com as lipases CRL e RML imobilizadas no suporte NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D) nas reações de transesterificação do óleo de microalgas, isolados ou combinados. Nos ensaios foram utilizados 5% m/m de cada complexo (totalizando 5 e 10% para os casos isolados e combinados, respectivamente), banho térmico a 30°C, razão molar final óleo:etanol 1:4 (adição em 4 etapas de volumes iguais de álcool, nos tempos 0, 3, 6 e 9 horas) e agitação magnética 300 rpm por 12 horas .	67
Figura 16: Aplicação da lipase CALB na forma livre ou imobilizada nas reações de esterificação do ácido oleico via rota etílica, razão molar 1:2 (ácido:álcool), temperatura de 45°C, sob agitação magnética 300 rpm por 12 horas. *A quantidade de enzima livre utilizada foi 3 vezes a quantidade de enzima presente na quantidade de complexo NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D) utilizada em reação.	76
Figura 17: Modelagem da abertura da <i>lid</i> das lipases CRL e CALB, com detalhes a direita.	80
Figura 18: Potenciais eletrostáticos das lipases CRL e CALB em conformações abertas ou fechadas, comparadas com as lipases TLL e RML em conformação fechada.	82
Figura 19: Cálculo dos volumes dos sítios catalíticos das lipases em conformação aberta, e das cavidades formadas nas conformações fechadas, relacionadas ou não ao sítio catalítico.	84
Figura 20: Difrátogramas de raios X das nanozeólitas TS-1 e ZSM-5 como sintetizadas, e após calcinação a 500 e 450°C respectivamente.	86
Figura 21: MEV das amostras de TS-1 e ZSM-5 após calcinação.	87
Figura 22: Análises de FTIR das nanozeólitas TS-1 e ZSM-5 calcinadas (preto), após tratamento com APTMS (vermelho) e com APTMS+GA (azul) de 4000-400 cm ⁻¹ (esquerda) e 4000-1500 cm ⁻¹ (direita).	88
Figura 23: Análises de FTIR dos complexos formados após a imobilização da lacase LPO nas nanozeólitas TS-1 e ZSM-5 após primeira ou segunda etapa de funcionalização. Para comparação, espectros pertinentes aos suportes sem enzima também ilustrados. Região de 1800-1600 cm ⁻¹ .	89

Lista de Tabelas

Tabela 1: Percentual de Imobilização, carga enzimática e atividade lipolítica para os complexos das lipases TLL, RML e CRL com o suporte NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D).	61
Tabela 2: Aplicações da lipase RML imobilizada em diferentes suportes em reações de transesterificação de óleos.	70
Tabela 3: Parâmetros cinéticos (aparentes K_m e V_{max}) determinados a partir ajuste não linear (<i>Hill fit</i> Origin [®] -pro8) para as lipases TLL e RML livres e imobilizadas para dois substratos diferentes.	72
Tabela 4: Percentual de Imobilização, carga enzimática e atividade lipolítica dos complexos com a lipase CALB com os suportes NaX-Na ⁺ e NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D).	74

Tabela 5: Acidez remanescente (% relativo à acidez inicial) e percentual de conversão em ésteres etílicos (FAEEs) obtidos das reações de transesterificação/esterificação do óleo de macaúba na presença de complexos envolvendo as lipases CALB e TLL e de CALB na forma livre..... 78

Tabela 6: Percentual de imobilização, massa de proteína adsorvida e atividade enzimática da LPO na forma livre e imobilizada. 91

Lista de Equações

Equação 1: Proteína Adsorvida	52
Equação 2: Atividade lipolítica >> hidrólise de azeite de oliva emulsificado	53
Equação 3: Atividade lipolítica >> hidrólise de palmitato p-nitrofenila	54
Equação 4: Teor de ésteres etílicos (FAEEs)	57

Lista de Abreviaturas

ABTS	2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
APTMS	(3-aminopropil) trimetóxisilano
APTS	3-aminopropiltriétoxisilano
ASB	Albumina de Soro Bovino
CALB	lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
DCM	Diclorometano
DRX	Difração de Raios-X
FAEEs	<i>Fatty acid ethyl esters</i>
FAU	Nanozeólita Faujasita tipo X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
m/m	Relação percentual de massas em comparação. Geralmente referente à massa de catalisador em relação a massa de substrato utilizada.
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
p-NPP	Palmitato p- Nitrofenila
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>

TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
TS-1	Zeólita Titânio Silicato-1
U	Unidade de atividade enzimática
V_{max}	Parâmetro cinético de reação: velocidade máxima de reação
ZSM-5	Zeólita denominada “Zeolite Socony Mobil-5”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Biodiesel.....	20
2.2	Produção de Biodiesel.....	20
2.2.1	Fontes	20
2.2.2	Tecnologias aplicadas à produção de biodiesel.....	21
2.2.3	Processos catalíticos aplicados à produção de Biodiesel	22
2.2.4	O uso de lipases na produção de Biodiesel	24
2.3	Imobilização enzimática em suportes sólidos	25
2.4	Zeólitas	26
2.4.1	Síntese de Zeólitas.....	28
2.4.2	Aplicações das Zeólitas	28
2.4.3	Imobilização de enzimas em zeólitas	30
2.5	Nanozeólitas.....	31
2.6	Imobilização de lipases em zeólitas para a produção de biodiesel.....	32
2.7	Especificidades posicionais das lipases na clivagem de triglicerídeos	33
2.8	Parâmetros cinéticos (k_m e V_{max}) para lipases livres e imobilizadas	35
2.9	Glicerol.....	37
2.9.1	Química do glicerol.....	37
2.9.2	Oxidação do Glicerol	37
2.10	Lacases	39
2.11	Sistemas lacase-mediador	40
2.12	Imobilização de lacases e aplicações.....	42
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivos Gerais.....	44
3.2	Objetivos específicos.....	44
4	MATERIAIS	46
5	MÉTODOS	47
5.1	Síntese dos suportes nanozeolíticos	47
5.1.1	Nanozeólita Faujasita tipo X (NaX-Na^+)	47
5.1.2	Nanozeólita Titanosilicato (TS-1).....	47
5.1.3	Nanozeólita ZSM-5	48
5.2	Troca Iônica	48

5.3	Funcionalização química da superfície das nanozeólita TS-1 e ZSM-5	48
5.3.1	Primeira etapa: Tratamento Químico de substituição de grupamentos hidroxilas da superfície da nanozeólita por grupamentos aminosilanos (silanização).....	49
5.3.2	Segunda Etapa: Funcionalização com Glutaraldeído das nanozeólitas quimicamente modificadas	49
5.4	Caracterização dos suportes nanozeolíticos obtidos.....	50
5.4.1	Difração de Raios-X (DRX).....	50
5.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
5.4.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	50
5.5	Imobilização Enzimática nos suportes nanozeolíticos	51
5.6	Determinação de proteína imobilizada.....	52
5.7	Estudos Catalíticos da lipase livre e dos complexos nanozeólita/enzima	52
5.7.1	Atividade enzimática a partir da hidrólise de azeite de oliva emulsificado.	52
5.7.2	Cinética Enzimática.....	53
5.8	Determinação da atividade enzimática da lacase LPO.....	55
5.9	Reação de Transesterificação do óleo de Microalgas e de Macaúba e Esterificação do ácido oleico 56	
5.10	Análises por Cromatografia Gasosa do Teor dos Ésteres Etílicos	56
5.11	Reação de Oxidação do Glicerol.....	57
5.12	Análise por cromatografia gasosa (CG) dos produtos de oxidação do glicerol	57
5.13	Ferramentas de bioinformática aplicadas ao estudo de lipases	57
5.13.1	Potencial Eletrostático da Superfície das lipases.....	58
5.13.2	Análise de modos normais em proteínas.....	58
5.13.3	Dinâmica Molecular	59
5.13.4	Cálculo dos volumes dos sítios catalíticos das lipases	59
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
6.1	Estudos relacionados aos complexos lipases/nanozeólitas.....	60
6.1.1	Variação nas condições de troca iônica da nanozeólita NaX-Na ⁺ com Ni ²⁺	60
6.1.2	Imobilização das lipases TLL, RML e CRL no suporte NaX-Ni ²⁺ (0,5M-3D) e estudos dos complexos formados.....	61
6.1.3	Estabilidade térmica lipase RML após imobilização.	68
6.1.4	Estudo dos parâmetros cinéticos das lipases TLL e RML livres e dos respectivos complexos	71
6.1.5	Imobilização e aplicação da lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CALB).	74
6.1.6	Aplicação de ferramentas de bioinformática.....	79
6.2	Estudos relacionados aos complexos lacases/nanozeólitas	86

6.2.1	Síntese e caracterização das nanozeólitas TS-1 e ZSM-5	86
6.2.2	Funcionalização química das nanozeólitas TS-1 e ZSM-5 e imobilização da lacase LPO acompanhada por FTIR.....	87
6.2.3	Estudo dos complexos LPO/(nanozeólitas funcionalizadas).....	90
6.2.4	Aplicação dos complexos ZSM-5-APTMS-GA-LPO e TS-1-APTMS-GA-LPO na reação de oxidação do glicerol na presença do mediador TEMPO.....	91
7	CONCLUSÕES.....	93
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	94
	REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

É de comum conhecimento a preocupação mundial em relação aos principais temas relacionados ao setor energético, como por exemplo, a finitude das reservas de petróleo e demais combustíveis fósseis, poluição ambiental pela queima destes combustíveis e o concomitante aquecimento global, dentre outros. A busca por fontes alternativas de energia têm ganhado cada vez mais interesse da comunidade científica ao redor do mundo, e dentre estas fontes, o biodiesel pode ser destacado como promissor.

O biodiesel trata-se do combustível similar (quimicamente e energeticamente) ao diesel obtido de fontes biológicas (óleos de origem vegetal, animal ou microbiano), e que pode ser usado em motor a diesel, com vantagem de ser obtido de fonte renovável. Este biocombustível pode ser obtido por diferentes processos catalíticos, dos quais se destaca a transesterificação. Esta reação trata-se da clivagem das moléculas de triglicerídeos que formam os óleos, na presença de um álcool (geralmente metanol) e de um catalisador (homogêneo, heterogêneo ou enzimático) em ésteres alquílicos (biodiesel) e glicerol (subproduto da reação).

A obtenção de biodiesel é mediada principalmente por catalisadores homogêneos básicos, devido ao baixo custo e sua alta reatividade. Apesar disso, diversas desvantagens podem ser apontadas para processos que envolvem catalisadores homogêneos, principalmente em relação à separação destes do produto e da recuperação após processo reacional. Em contrapartida, o uso de catalisadores heterogêneos é uma alternativa bastante interessante neste tipo de processo industrial, devido à possibilidade de fácil recuperação destes catalisadores ao final da reação, e sua reutilização, que reduzem os custos envolvidos neste processo catalítico.

Em questão a especificidade e de condições reacionais, os catalisadores enzimáticos (lipases em geral) recebem destaque (altas especificidades e reações em condições brandas), mas possuem embutidos os altos custos de produção e a difícil recuperação do meio reacional, que as tornam de baixo interesse industrial. Como alternativa de reduzir os custos envolvidos na catálise enzimática, a imobilização de lipases em suportes sólidos, como por exemplo, as zeólitas (também catalisadores, mas heterogêneos), têm ganhado grande atenção, assim como suas aplicações nas reações de transesterificação, combinando vantagens das catálises heterogênea e enzimática, e até mesmo resultando em melhoras no potencial catalítico dos complexos quando comparados com os catalisadores isolados.

Diversos grupos de pesquisa estão engajados na melhora dos processos de produção de biodiesel, seja na busca de fontes alternativas de biomassa, na obtenção de novos processos catalíticos com melhores rendimentos e menores custos, ou na otimização dos processos existentes.

O ambiente científico e contexto relatado motivaram este trabalho, que tratou da síntese de materiais zeolíticos em escala nanométrica (nanozeólitas), seu uso como suporte para imobilização de lipases, e a aplicação dos biocatalisadores heterogêneos obtidos nas reações de transesterificação do óleo de Microalgas via rota etílica. Em conjunto, todas as etapas do trabalho se direcionaram a busca de um sistema catalítico alternativo, de possível interesse industrial, e principalmente, de natureza limpa e sustentável.

7 CONCLUSÕES

A partir das sínteses, caracterizações, aplicações e demais estudos dos suportes e dos complexos formados por imobilização nos sistemas propostos, conclui-se:

- I. O suporte nanozeolítico (FAU) tratado por troca iônica com níquel foi efetivo na imobilização das lipases TLL, RML, CRL e CALB.
- II. Foi possível determinar condições ótimas reacionais para os complexos com TLL e RML no sistema estudado. O complexo com a lipase TLL aplicado na reação de transesterificação do óleo de microalgas, na condição ótima (5% m/m de catalisador, adição única de etanol em razão molar 1:4, 12 horas de reação a 35°C) converteu 85% do óleo em ésteres etílicos, enquanto o complexo com RML atingiu 52 % de conversão (5% m/m de catalisador, adição em 4 etapas de etanol em razão molar 1:4, 12 horas de reação a 35°C).
- III. Os complexos com TLL e CALB aplicados em reações de esterificação de ácido oleico de 12 horas, a 45°C, 5% m/m de catalisador, adição única de etanol em razão molar 1:2, produziram 89 e 83% de FAEEs, respectivamente. Ambos complexos aplicados em condições análogas (exceção razão molar de 1:6) na reação de transesterificação/esterificação de óleo de Macaúba converteram 52% (CALB) e 67% (TLL) do óleo em ésteres etílicos. Portanto, a lipase CALB apresenta principalmente atividade esterificante, e baixa atividade transesterificante.
- IV. Com o uso de azeite de oliva emulsificado como substrato, foram determinados os parâmetros cinéticos para as lipases TLL e RML nas formas livre e imobilizada. Os valores de K_m para TLL e RML livre/imobilizada foram de $1110 \pm 140/1230 \pm 30$ e $1700 \pm 200/600 \pm 40$ mM respectivamente, enquanto os valores de V_{max} foram de $451 \pm 31/535 \pm 10$ (TLL livre/imobilizada) e $341 \pm 28/290 \pm 9$ (RML livre/imobilizada) em $\mu\text{moles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.
- V. A distância entre os carbonos gama dos resíduos Pro-74 e Pro-443 da CRL após análises de modos normais foi apenas 0,1 Å superior que a distância calculada na estrutura cristalográfica em conformação fechada (3,8 Å), e de 6,5 Å nas simulações de dinâmica molecular, resultados muito inferiores à distância de 21,3 Å encontrada na estrutura em conformação aberta, o que a princípio permite atribuir os baixos desempenhos do complexo com essa enzima à restrição do seu sítio catalítico ao substrato pela não abertura de sua *lid*.

- VI. Para lipase CALB, uma distância de 14,3 Å entre os carbonos gama dos resíduos Ile-144 e Leu-285 foi encontrada nas simulações de dinâmica molecular, distância essa cerca de 3 vezes superior a distância calculada em sua estrutura cristalográfica em conformação aberta (6Å), o que em princípio pode ser atribuído a presença do solvente e está em concordância com as observações experimentais.
- VII. Nos estudos iniciais envolvendo a lacase LPO, foi possível obter complexos a partir da imobilização de enzima em nanozeólitas funcionalizadas com atividades catalíticas, mas a aplicação do complexo na reação de oxidação de glicerol mediada por TEMPO não foi efetiva para as condições estudadas.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuros estudos delineados para esses sistemas são:

1. Estudos de *molecular docking*, visando correlacionar os dados experimentais para a reação de esterificação da lipase de *Candida antarctica* B e sua estrutura molecular. No caso verificar se a abertura do seu sítio catalítico limita acesso a triglicerídeos (maiores) e não a ácidos graxos livres (menores).
2. Simulações de Dinâmica Molecular de outras lipases na presença de metanol.
3. Estudos aprofundados e sistemáticos para o sistema envolvendo a enzima lacase, para possível aplicação de complexos lacase-nanozeólitas nas reações de oxidação do glicerol levando a formação de algum produto de interesse.
4. Aplicações dos complexos em biorreatores de bancada visando uma aplicação industrial em larga escala, com foco para o óleo de macaúba, de interesse ambiental e econômico.

REFERÊNCIAS

- 1 ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.
- 2 MA, F. R.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.
- 3 HOEKMAN, S. K. et al. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 143-169, 2012.
- 4 YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, n. 1-3, p. 262-267, 2007.
- 5 MACARIO, A. et al. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. In: GEDEON, A.; MASSIANI, P., *et al* (Ed.). **Zeolites and Related Materials: Trends, Targets and Challenges, Proceedings of the 4th International Feza Conference**, v.174, 2008. p.1011-1016. (Studies in Surface Science and Catalysis).
- 6 PARENTE, E. J. D. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. **Fortaleza: tecbio**, 2003.
- 7 QUIRINO, B. et al. Critical Analysis of Feedstock Availability and Composition, and New Potential Resources for Biodiesel Production in Brazil. In: DA SILVA, S. S. e CHANDEL, A. K. (Ed.). **Biofuels in Brazil**: Springer International Publishing, 2014. cap. 15, p.331-350.
- 8 FERREIRA, J. R.; CRISTO, C. O futuro da indústria: biodiesel–coletânea de artigos. **Brasília: MDIC-STI/IEL**, 2006.
- 9 CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- 10 CHING, W. H.; RODRIGUES, C. W. Cartilha biodiesel. **São Paulo, SEBRAE**, 2010.
- 11 MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.
- 12 VAN LEEUWEN, P. W. N. M. **Homogeneous catalysis: understanding the art**. Springer Science & Business Media, 2006.
- 13 GORJI, A.; GHANEI, R. A review on catalytic biodiesel production. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)**, v. 5, n. 4, p. 48-59, 2014.

- 14 DE SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 133-137, 2010.
- 15 HOYDONCKX, H. E. et al. Esterification and transesterification of renewable chemicals. **Topics in Catalysis**, v. 27, n. 1-4, p. 83-96, 2004.
- 16 GRANADOS, M. L. et al. Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 73, n. 3-4, p. 317-326, 2007.
- 17 SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable-oils. **Fuel**, v. 66, n. 10, p. 1372-1378, 1987.
- 18 FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable-oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984.
- 19 DEUTSCHMANN, O. et al. - Heterogeneous Catalysis and Solid Catalysts. 2000.
- 20 DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: a critical overview on the current status and perspectives at the academy and industry. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.
- 21 PINTO, A. C. et al. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.
- 22 JOHANNES, T. et al. BIOT 20-Development of a novel phosphite dehydrogenase based NAD(P)H regeneration system for industrial biocatalysis. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 232, 2006.
- 23 MOREAU, P. et al. Influence of zeolite structure on ethylbenzene transformation. In: ANTOINE GÉDÉON, P. M. A. F. B. (Ed.). **Studies in Surface Science and Catalysis**: Elsevier, v. Volume 174, Part B, p.1179-1182, 2008.
- 24 SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.
- 25 GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, 2015.
- 26 JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.
- 27 RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 64, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

- 28 DEREWENDA, U. et al. Catalysis at the interface - the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532-1541, 1992.
- 29 MILLER, R. D. In search of low-k dielectrics. **Science**, v. 286, p. 421-423, 1999.
- 30 REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.
- 31 SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.
- 32 KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.
- 33 MOREIRA, A. B. R. et al. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689-3694, 2007.
- 34 FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013.
- 35 SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.
- 36 FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S. et al. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, p. 101-108, 2006.
- 37 MACARIO, A. et al. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2-4, p. 328-335, 2007.
- 38 BRECK, D. W. Zeolite molecular sieves: structure. **Chemistry and Use, Wiley, New York**, v. 636, 1974.
- 39 BRECK, D. W. **Zeolite molecular sieves**. Krieger, 1984.
- 40 BEKKUM, H. V.; JANSEN, J. C.; FLANIGEN, E. M. Introduction to zeolite science and practice. 1991.
- 41 MEIER, W. M. Zeolite structures. **Molecular sieves**, p. 10-27, 1968.
- 42 BAERLOCHER, C.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. **Atlas of zeolite framework types**. Elsevier, 2007.
- 43 GHOBARKAR, H.; SCHÄF, O.; GUTH, U. Zeolites - from kitchen to space. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 27, n. 2-4, p. 29-73, 1999.

- 44 WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. **Solid State Ionics**, v. 131, n. 1–2, p. 175-188, 2000.
- 45 CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: History and development from the earliest days to the present time. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 663-701, 2003.
- 46 WEITKAMP, J.; PUPPE, L. **Catalysis and zeolites: fundamentals and applications**. Springer Science & Business Media, 2013.
- 47 KALLO, D. Applications of natural zeolites in water and wastewater treatment. **Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Applications**, v. 45, p. 519-550, 2001.
- 48 TORII, K.; SAND, L. B.; MUMPTON, F. A. **Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Use**: Pergamon Press, Elmsford, New York 1978.
- 49 DABROWSKI, A. et al. Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. **Chemosphere**, v. 56, n. 2, p. 91-106, 2004.
- 50 DOULA, M. K. Removal of Mn^{2+} ions from drinking water by using Clinoptilolite and a Clinoptilolite-Fe oxide system. **Water Research**, v. 40, n. 17, p. 3167-3176, 2006.
- 51 PÉREZ-RAMÍREZ, J. et al. Hierarchical zeolites: enhanced utilisation of microporous crystals in catalysis by advances in materials design. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 11, p. 2530-2542, 2008.
- 52 BRITO, A.; BORGES, M. E.; OTERO, N. Zeolite Y as a heterogeneous catalyst in biodiesel fuel production from used vegetable oil. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3280-3283, 2007.
- 53 XIE, W.; HUANG, X.; LI, H. Soybean oil methyl esters preparation using NaX zeolites loaded with KOH as a heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 936-939, 2007.
- 54 SHU, Q. et al. Synthesis of biodiesel from soybean oil and methanol catalyzed by zeolite beta modified with La^{3+} . **Catalysis Communications**, v. 8, n. 12, p. 2159-2165, 2007.
- 55 GONCALVES, A. P. V. et al. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 2, p. 93-101, 1997.
- 56 GONCALVES, A. P. V. et al. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 1, n. 2, p. 53-60, 1996.
- 57 SERRALHA, F. N. et al. Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 4, n. 5-6, p. 303-311, 1998.

- 58 IQBAL, J.; IQBAL, S.; MÜLLER, C. E. Advances in immobilized enzyme microbioreactors in capillary electrophoresis. **Analyst**, v. 138, n. 11, p. 3104-3116, 2013.
- 59 DAVID, A. E. et al. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 395-407, 2006.
- 60 HAGGERTY, G. M.; BOWMAN, R. S. Sorption of chromate and other inorganic anions by organo-zeolite. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 3, p. 452-458, 1994.
- 61 RICHER, R.; MERCIER, L. Direct synthesis of functionalized mesoporous silica by non-ionic alkylpolyethyleneoxide surfactant assembly. **Chemical Communications**, n. 16, p. 1775-1776, 1998.
- 62 ZHAN, B. Z.; WHITE, M. A.; LUMSDEN, M. Bonding of organic amino, vinyl, and acryl groups to nanometer-sized NaX zeolite crystal surfaces. **Langmuir**, v. 19, n. 10, p. 4205-4210, 2003.
- 63 TOSHEVA, L.; VALTCHEV, V. P. Nanozeolites: Synthesis, crystallization mechanism, and applications. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 10, p. 2494-2513, 2005.
- 64 ZHOU, X. et al. Nanozeolite-assembled interface towards sensitive biosensing. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 7, p. 1525-1529, 2007.
- 65 ZHANG, Y. H. et al. Enrichment of low-abundance peptides and proteins on zeolite nanocrystals for direct MALDI-TOF MS analysis. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 4, p. 615-617, 2005.
- 66 YU, T. et al. Controlled nanozeolite-assembled electrode: Remarkable enzyme-immobilization ability and high sensitivity as biosensor. **Chemistry-a European Journal**, v. 12, n. 4, p. 1137-1143, 2006.
- 67 KANG, Y. J. et al. Uniform nanozeolite microspheres with large secondary pore architecture. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 7, p. 1861-1866, 2006.
- 68 JI, J. et al. Enhanced protein digestion through the confinement of nanozeolite-assembled microchip reactors. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 2457-2463, 2008.
- 69 DE VASCONCELLOS, A. et al. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 163, p. 343-355, 2012.
- 70 DE VASCONCELLOS, A. et al. Potential new biocatalysts for biofuel production: the fungal lipases of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolitic supports ion exchanged with transition metals. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 214, p. 166-180, 2015.

- 71 ŠINKŪNIENĖ, D.; ADLERCREUTZ, P. Effects of regioselectivity and lipid class specificity of lipases on transesterification, exemplified by biodiesel production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 7, p. 1283-1290, 2014.
- 72 TRAN, D.-T. et al. Kinetics of transesterification of olive oil with methanol catalyzed by immobilized lipase derived from an isolated Burkholderia sp. strain. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 193-203, 2013.
- 73 MENG, Z. et al. Preliminary Study on Acyl Incorporation and Migration in the Production of 1, 3-diacylglycerol by Immobilized Lipozyme RM IM-catalyzed Esterification. **Food Science and Technology Research**, v. 20, n. 2, p. 175-182, 2014.
- 74 PACHECO, C.; CRAPISTE, G. H.; CARRÍN, M. E. Study of acyl migration during enzymatic interesterification of liquid and fully hydrogenated soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 117-124, 2015.
- 75 LI, R. et al. Study on the enzyme's 1, 3-positional specificity during lipozyme TL-mediated biodiesel production. **RSC Advances**, v. 5, n. 77, p. 62460-62468, 2015.
- 76 LEE, J. H. et al. Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 12, p. 1927-1931, 2008.
- 77 LEE, J. H. et al. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 2105-2108, 2011.
- 78 GUAN, F. et al. Combination of two lipases more efficiently catalyzes methanolysis of soybean oil for biodiesel production in aqueous medium. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1677-1682, 2010.
- 79 LEE, J. H. et al. Co-immobilization of *Candida rugosa* and *Rhyzopus oryzae* lipases and biodiesel production. **Korean J Chem Eng**, v. 30, n. 6, p. 1335-1338, 2013.
- 80 BISSWANGER, H. **Enzyme Kinetics. Principles and Methods. 2002**: Wiley-VCH, Weinheim.
- 81 RANJBAKHS, E. et al. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 179, p. 272-276, 2012.
- 82 CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197-204, 2004.
- 83 PAIVA, A. L.; BALCAO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases☆. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 3, p. 187-204, 2000.

- 84 GUO, Z.; BAI, S.; SUN, Y. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 7, p. 776-782, 2003.
- 85 BAYRAMOGLU, G. et al. Immobilized lipase on micro-porous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 95, p. 12-21, 2015.
- 86 CABRERA-PADILLA, R. Y. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 289-298, 2012.
- 87 REIS, P. et al. Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 12, n. 1–2, p. 163-170, 2009.
- 88 REIS, P. et al. Interfacial mechanism of lipolysis as self-regulated process. **Biophysical Chemistry**, v. 147, n. 3, p. 93-103, 2010.
- 89 TAN, H. W.; ABDUL AZIZ, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118-127, 2013.
- 90 QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO JR, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475-493, 2013.
- 91 ARDI, M. S.; AROUA, M. K.; HASHIM, N. A. Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1164-1173, 2015.
- 92 ZHOU, C.-H. C. et al. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 3, p. 527-549, 2008.
- 93 LIEBMINGER, S.; SIEBENHOFER, M.; GUEBITZ, G. Oxidation of glycerol by 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in the presence of laccase. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4541-4545, 2009.
- 94 GARCIA, R.; BESSON, M.; GALLEZOT, P. Chemoselective catalytic oxidation of glycerol with air on platinum metals. **Applied Catalysis A: General**, v. 127, n. 1, p. 165-176, 1995.
- 95 KETCHIE, W. C.; MURAYAMA, M.; DAVIS, R. J. Selective oxidation of glycerol over carbon-supported AuPd catalysts. **Journal of catalysis**, v. 250, n. 2, p. 264-273, 2007.
- 96 DEMIREL, S. et al. Use of renewables for the production of chemicals: Glycerol oxidation over carbon supported gold catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 70, n. 1–4, p. 637-643, 2007.

- 97 THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.
- 98 MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.
- 99 CRESTINI, C.; JURASEK, L.; ARGYROPOULOS, D. S. On the mechanism of the laccase–mediator system in the oxidation of lignin. **Chemistry-A European Journal**, v. 9, n. 21, p. 5371-5378, 2003.
- 100 DESAI, S. S.; NITYANAND, C. Microbial laccases and their applications: a review. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 98-124, 2011.
- 101 SOSNA, M. et al. Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 34, p. 10018-10026, 2010.
- 102 FABBRINI, M. et al. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 43, p. 7551-7553, 2001.
- 103 FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 5, p. 231-240, 2002.
- 104 KUDANGA, T. et al. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 195-208, 2011.
- 105 HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3, p. 330-336, 2000.
- 106 JOLIVALT, C. et al. Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 103-113, 2000.
- 107 SILVA, C. et al. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6, 6 fibres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6, p. 867-875, 2007.
- 108 GEORGIEVA, S. et al. Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, n. 3, p. 177-184, 2008.
- 109 REKUĆ, A. et al. Very stable silica-gel-bound laccase biocatalysts for the selective oxidation in continuous systems. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2076-2083, 2010.

- 110 BAUTISTA, L. F.; MORALES, G.; SANZ, R. Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8541-8548, 2010.
- 111 WANG, F. et al. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 8931-8935, 2010.
- 112 REKUĆ, A. et al. Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 191-198, 2009. ISSN 1359-5113.
- 113 SALIS, A. et al. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1, p. 175-180, 2009.
- 114 TRIMBUR, D. E. et al. **Heterotrophic microalgae expressing invertase**: Google Patents 2013.
- 115 ZHAN, B. Z. et al. Control of particle size and surface properties of crystals of NaX zeolite. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 9, p. 3636-3642, 2002.
- 116 ZHAN, B. Z. et al. A novel, organic-additive-free synthesis of nanometer-sized NaX crystals. **Chemical Communications**, n. 13, p. 1176-1177, 2001.
- 117 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites Part II: Preparation, characterisation and properties of colloidal silicalite-1, TS-1, silicalite-2 and TS-2. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 72, n. 1-3, p. 67-80, 2004.
- 118 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O.; PLAISTED, R. J. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites. Part 1: synthesis of colloidal silicalite-1 and titanosilicalite-1 (TS-1). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 66, n. 2-3, p. 143-156, 2003.
- 119 BIEMMI, E.; BEIN, T. Assembly of Nanozeolite Monolayers on the Gold Substrates of Piezoelectric Sensors. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 11196-11202, 2008.
- 120 NERY, J. G.; MASCARENHAS, Y. P.; CHEETHAM, A. K. A study of the highly crystalline, low-silica, fully hydrated zeolite P ion exchanged with (Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) cations. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 57, n. 3, p. 229-248, 2003.
- 121 CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. D.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

- 122 WU, X. Y.; JAASKELAINEN, S.; LINKO, Y. Y. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, n. 2, p. 145-158, 1996.
- 123 BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- 124 SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999.
- 125 MUSTRANTA, A.; FORSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 2, p. 133-139, 1993.
- 126 SILVA, N. C. A. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139-149, 2014.
- 127 WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia-marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.
- 128 KRIEGER, N. et al. Kinetic characterization of *Penicillium citrinum* lipase in AOT/isooctane-reversed micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 67, n. 1-2, p. 87-95, 1997.
- 129 NIKU-PAAVOLA, M. L.; RAASKA, L.; ITÄVAARA, M. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. **Mycological Research**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1990.
- 130 DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W665-7, 2004.
- 131 LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins**, v. 78, n. 8, p. 1950-8, 2010.
- 132 BAKER, N. A. et al. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 18, p. 10037-10041, 2001.
- 133 DELANO, W. L. The PyMOL molecular graphics system. 2002.
- 134 BAHAR, I. et al. Normal mode analysis of biomolecular structures: functional mechanisms of membrane proteins. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 3, p. 1463-97, 2010.

- 135 PONDER, J. **TINKER Software Tools for Molecular Design, Version 4.1**,
 Washington University School of Medicine, available from
<http://dasher.wustl.edu/tinker> 2003.
- 136 HESS, B. et al. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and
 scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4,
 n. 3, p. 435-447, 2008.
- 137 VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of
 Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.
- 138 MALDE, A. K. et al. An automated force field topology builder (ATB) and
 repository: version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12,
 p. 4026-4037, 2011.
- 139 ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of
 Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577-8593, 1995.
- 140 BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity
 rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 2007.
- 141 BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in
 effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269-6271,
 1987.
- 142 HESS, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation.
Journal of Chemical Theory and Computation, v. 4, n. 1, p. 116-122, 2008.
- 143 YU, J. et al. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities
 with a rolling probe sphere. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 46-52, 2010.
- 144 CASTAGNOLA, N. B.; DUTTA, P. K. Nanometer-sized zeolite X crystals: Use as
 photochemical hosts. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 10, p. 1696-1702,
 1998.
- 145 KARMEE, S. K. Lipase Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Crude
 Pongamia Oil. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental
 Effects**, v. 37, n. 5, p. 536-542, 2015.
- 146 RODRIGUES, R. C. et al. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification
 reactions of vegetable oils and short chain alcohols. **Journal of the American Oil
 Chemists' Society**, v. 85, n. 10, p. 925-930, 2008.
- 147 LOTTI, M. et al. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues
 in the production of biodiesel. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 22-30, 2015.
- 148 BRUNO, L. M. et al. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on
 polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology
 & Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005.

- 149 LEE, D. H. et al. Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 6, p. 522-525, 2006.
- 150 BERGAMASCO, J. et al. Enzymatic transesterification of soybean oil with ethanol using lipases immobilized on highly crystalline PVA microspheres. **Biomass and Bioenergy**, v. 59, p. 218-233, 2013.
- 151 MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- 152 SELMI, B.; THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 6, p. 691-695, 1998.
- 153 SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.
- 154 SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 11, p. 656-660, 2003.
- 155 SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 2, p. 103-106, 2003.
- 156 RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682-688, 2011.
- 157 SALIS, A. et al. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 3, p. 291-299, 2005.
- 158 KUMARI, V.; SHAH, S.; GUPTA, M. N. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from *Madhuca indica*. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 1, p. 368-372, 2007.
- 159 BABAKI, M. et al. Effect of water, organic solvent and adsorbent contents on production of biodiesel fuel from canola oil catalyzed by various lipases immobilized on epoxy-functionalized silica as low cost biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 93-99, 2015.
- 160 VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.
- 161 FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 242-250, 2007.

- 162 FEDOSOV, S. N. et al. Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 156-168, 2013.
- 163 KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N.; WENZEL, B. M. Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.
- 164 PHUAH, E.-T. et al. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 91-97, 2012.
- 165 ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A. C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 3, p. 106-113, 2006.
- 166 LAI, C. C. et al. Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 331-337, 2005. ISSN 1097-4660.
- 167 SANCHEZ, F.; VASUDEVAN, P. T. Enzyme catalyzed production of biodiesel from olive oil. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 1-14, 2006.
- 168 NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692-700, 2008.
- 169 LI, L. et al. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1, p. 58-62, 2006.
- 170 ABO, M.; CHRISTENSEN, M. W. **Production of fatty acid alkyl esters by use of two lipolytic enzymes**: Google Patents 2006.
- 171 ROSSET, I. G. et al. Enzymatic esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* lipase. **Catalysis letters**, v. 143, n. 9, p. 863-872, 2013.
- 172 PANG, J. et al. Esterification of oleic acid with methanol by immobilized lipase on wrinkled silica nanoparticles with highly ordered, radially oriented mesochannels. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 35-42, 2016.
- 173 OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Editora Manole Ltda, 2006.
- 174 REHM, S.; TRODLER, P.; PLEISS, J. Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. **Protein Science**, v. 19, n. 11, p. 2122-2130, 2010.

- 175 STAUCH, B.; FISHER, S. J.; CIANCI, M. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 12, p. 2348-2358, 2015.
- 176 BURNEY, P. R.; PFAENDTNER, J. Structural and dynamic features of *Candida rugosa* lipase 1 in water, octane, toluene, and ionic liquids BMIM-PF6 and BMIM-NO3. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 9, p. 2662-2670, 2013.
- 177 JUNG, K. T.; SHUL, Y. G. Preparation of transparent TS-1 zeolite film by using nanosized TS-1 particles. **Chemistry of Materials**, v. 9, n. 2, p. 420-428, 1997.
- 178 PANDYA, P. H. et al. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 77, n. 1, p. 67-77, 2005.
- 179 SELVASEKARAPANDIAN, S. et al. Laser Raman and FTIR studies on Li⁺ interaction in PVAc-LiClO₄ polymer electrolytes. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, n. 5, p. 1234-1240, 2006.
- 180 CELIKBICAK, O. et al. Immobilization of laccase on hairy polymer grafted zeolite particles: Degradation of a model dye and product analysis with MALDI-ToF-MS. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 199, p. 57-65, 2014.
- 181 KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.
- 182 HONG, C. S. et al. Enzymatic Conversion of glycerol to glyceric Acid with immobilised laccase in Na-alginate matrix. **Procedia Chemistry**, v. 16, p. 632-639, 2015.