



URI - ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B

EM POLIURETANO

NÁDIA LIGIANARA DEWES NYARI

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

ABRIL, 2013

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B
EM POLIURETANO**

Nádia Ligianara Dewes Nyari

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof^a. Elisandra Rigo, D. Sc.

Orientadora

Prof. Rogério Marcos Dallago, D. Sc.

Orientador

Prof^a. Anielia Pinto Kempka, D. Sc.

Prof^a. Jamile Zeni, D. Sc.

Erechim, 01 de abril de 2013

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECADA URI – ERECHIM.

AGRADECIMENTOS

A todas as forças do universo...

À minha família, aos meus pais Celi e Maria Cirilei pela motivação e por trazer-me apoio incondicional, meu guia e pilar nos momentos difíceis e por acreditar nos meus sonhos e por tantos momentos de amor, alegria e felicidade.

Ao meu irmão Vanderlei, por acreditar e me apoiar em meu objetivo.

Aos professores Rogério Marcos Dallago e Elisandra Rigo, pela valorosa orientação, paciência, compreensão e amizade, mas principalmente, pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-ERECHIM, por os conhecimentos compartilhados e amizade.

Às minhas queridas amigas Jamile Zeni e Ilizandra Fernandes pela amizade verdadeira, ensinamentos, hospitalidade, pelos belos momentos compartilhados.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos que de uma forma ou outra sempre estiveram à disposição para ajudar-me, em especial à Juliana Zanatta e Diane Rigo. Muito obrigada a todos.

À URI- ERECHIM, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho.

A todos que não citei, mas que de alguma forma fizeram parte deste trabalho.

*Dedico esta conquista em especial
aos amores da minha vida:
meu pai Celi José,
minha mãe Maria Cirilei
e meu irmão Vanderlei
e todos aqueles que me apoiaram
e acreditaram nos meus sonhos.*

*"Nada se obtém sem esforço;
tudo se pode conseguir com ele."*

(Ralph Waldo Emerson)

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B
EM POLIURETANO**

Nádia Ligianara Dewes Nyari

Abril/2013

Orientadores: Elisandra Rigo

Rogério Marcos Dallago

A imobilização e estabilização das enzimas é uma das etapas mais importantes para o desenvolvimento de novos catalisadores, pois permite superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional no uso industrial das enzimas, tornando-as catalisadores ideais para processos específicos. As vantagens do uso de lipases imobilizadas em reações de síntese de ésteres são relatadas na literatura, considerando que esta viabiliza a elevação dos rendimentos sob suaves condições de operação, podendo dispensar etapas posteriores de purificação, assim o uso das lipase pode ser ampliado através do desenvolvimento de técnicas apropriadas de imobilização, que resultem em alta capacidade catalítica e rendimentos de produtos. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a imobilização da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) usando como suporte o poliuretano pelo método de confinamento. Os estudos foram realizados inicialmente em relação à concentração dos monômeros para elaboração do suporte bem como, da miscibilidade da enzima na mistura. A técnica de imobilização, bem como a estabilidade do imobilizado a diferentes temperaturas, e condições de manutenção foi avaliada pela atividade de síntese do ácido oléico e etanol. A capacidade de ciclos reacionais também foi verificada, assim como da aplicação da lipase imobilizada em reações de síntese de ésteres. Os resultados indicaram que a concentração dos monômeros de 75/25 % (poliol

e isocianato) foi à formulação que resultou em uma melhor formação da espuma, sendo este usado para imobilizar a enzima, a qual se apresentou estável (95 % da atividade inicial) após 150 dias de estocagem à temperatura ambiente e de geladeira, já à altas temperaturas (40 °C, 60 °C, 80 °C) foi observado a manutenção de 90 % da atividade inicial no período de 45 dias, tanto para estocagem do imobilizado à seco como imerso ao meio reacional. Estes resultados evidenciam a eficiência da imobilização no aumento da estabilidade da CAL B, considerando que esta na forma livre submetida a altas temperaturas, foi totalmente inativada após 2 horas a 80 °C, 12 horas a 60 °C e 24 horas a 40 °C ressaltando a sua fragilidade. A capacidade de ciclos reacionais foi de 35 ciclos quando o imobilizado foi mantido à seco entre as bateladas e/ou imerso no meio reacional, em temperatura ambiente, e 30 ciclos quando armazenadas à temperatura de geladeira e 40 °C em ambas as formas de manutenção entre os ciclos. A aplicação do imobilizado nas reações de produção de geranil propionato e geranil oleato resultou em conversões de 18,3 % e 31,2 % respectivamente e da síntese de oleato de etila em 83,2 %. A pesquisa indicou uma técnica promissora de imobilização da lipase CAL B relacionando a simplicidade do processo, o baixo custo do suporte e a capacidade de aplicação do biocatalizador em reações de interesse na indústria de alimentos.

Summary Dissertation submitted to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for obtaining the degree of Master in Food Engineering.

**STUDY OF THE IMOBILIZATION OF LIPASE *Candida antarctica* A
POLYURETHANE**

Nádia Ligianara Dewes Nyari

April/2013

Advisors: Elisandra Rigo
Rogério Marcos Dallago

Immobilization and stabilization of enzymes is one of the most important steps in the development of new catalysts because it allows overcoming the disadvantages of solubility in the reaction medium and the operational instability in the industrial use of enzymes, making them ideal catalysts for specific processes. The advantages of the use of immobilized lipases in reactions of ester synthesis are reported in the literature, whereas this makes it possible to increase yields under mild operating conditions, which can dispense subsequent stages of purification as well the use of lipase can be enlarged by developing appropriate techniques of immobilization, resulting in high catalytic ability and income products. In this context, this study aims to evaluate the immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CAL B) using polyurethane as support by the method of confinement. The studies were initially performed with respect to concentration of the monomers for preparation of the support as well as the miscibility of the enzyme in mixture. The technique of immobilization and the stability of immobilized at different temperatures, and main tenance conditions was assessed by synthesis activity of oleic acid and ethanol. The ability of recyclings reaction was also observed, as well as the application of immobilized lipase in ester synthesis reactions. The results indicated that the concentration of monomers of 75/25 % (polyol and isocyanate) was the formulation resulting in a better formation of foam, which is used to

immobilize the enzyme, which showed stable (95 % of initial activity) after 150 days of storage at room temperature and refrigerator, already at high temperatures (40 °C, 60 °C and 80 °C) was observed to maintain 90 % of initial activity within 45 days, both for storage asset to dry as immersed in reaction medium. These results demonstrate the efficiency of immobilization in increasing the stability of CAL B, whereas in this freeform subjected to high temperatures, was completely inactivated after 2 hours at 80 °C, 12 hours at 60 °C and 24 hours at 40 °C underscoring its fragility. The ability of recyclings reaction was 35 cycles when the asset was kept at dry between batches and / or immersed in the reaction medium at room temperature and 30 cycles of reuse when stored at refrigerator temperature and 40 °C in both forms of maintenance between recyclings. The application of immobilized reactions in production of propionate and geranyl geranyl oleate resulted in conversions of 18.3 % and 31.2 % respectively and the synthesis of ethyl oleate at 83.2 %. The survey indicated a promising technique for immobilization of lipase CAL B relating the simplicity of the process, the low cost and the ability to support the application of biocatalyst for reactions of interest in the food industry.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1 ENZIMAS | 19 |
| 2.1.1 Lipases | 22 |
| 2.1.1.1 Lipase de <i>Candida antarctica</i> tipo B..... | 24 |
| 2.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIPASES..... | 25 |
| 2.2.1 Aplicação da Lipase de <i>Candida antarctica</i> tipo B..... | 29 |
| 2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS | 30 |
| 2.3.1 Vantagens das e Desvantagens das Técnicas de Imobilização..... | 31 |
| 2.3.2 Métodos de imobilização | 33 |
| 2.3.2.1 Imobilização por Confinamento | 34 |
| 2.3.2.2 Imobilização por Ligação | 35 |
| 2.4 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO | 36 |
| 2.4.1 Poliuretanos (PU)..... | 37 |
| 2.5 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES | 41 |
| 2.6 ESTABILIDADE DAS LIPASES..... | 43 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 44 |
| 3.1 MATERIAIS | 44 |
| 3.1.1 Reagentes..... | 44 |
| 3.1.1.1 Enzima..... | 44 |
| 3.1.1.2 Suporte..... | 45 |
| 3.1.2 Equipamentos | 46 |
| 3.2 MÉTODOS..... | 46 |
| 3.2.1 Polimerização dos Monômeros..... | 46 |
| 3.2.2 Avaliação da Miscibilidade da Enzima nos Monômeros | 47 |
| 3.2.3 Imobilização | 48 |
| 3.2.4. Dosagem da Atividade de Esterificação | 49 |
| 3.2.5 Cálculo do Rendimento de Imobilização | 50 |
| 3.2.6 Avaliação da Estabilidade da Enzima Livre e Enzima Imobilizada | 51 |
| 3.2.7 Avaliação da Capacidade de Reciclos Reacionais da Lipase CAL B Imobilizada..... | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.8 Avaliação da Aplicação da Lipase CAL B Imobilizada na Catálise de Reações de Síntese | 53 |
| 3.2.8.1 Síntese Enzimática de Geraniol e Ácido Oleico..... | 53 |
| 3.2.8.2 Esterificação Enzimática de Geraniol e Ácido Propiônico | 54 |
| 3.2.8.3 Esterificação Enzimática de Ácido Oleico e Etanol | 54 |
| 3.2.8.4 Determinação do Rendimento das Reações de Síntese | 55 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 56 |
| 4.1 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO: SÍNTESE DO POLIURETANO (PU) | 56 |
| 4.2 AVALIAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DO IMOBILIZADO COM LIPASE CAL B LIOFILIZADA | 58 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DO IMOBILIZADO COM LIPASE CAL B SOLUBILIZADA EM DIFERENTES SOLVENTES..... | 59 |
| 4.4 RENDIMENTO..... | 61 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ENZIMA LIVRE..... | 62 |
| 4.6 ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA EM PU ARMAZENADA EM CONSTANTE DE DESATIVAÇÃO TÉRMICA | 63 |
| 4.7 AVALIAÇÃO DO REUSO DA LIPASE IMOBILIZADA | 65 |
| 4.8 AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA LIPASE CAL B IMOBILIZADA NA CATÁLISE DE REAÇÕES DE SÍNTESE | 68 |
| 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES | 70 |
| 5.1 CONCLUSÕES | 70 |
| 5.2 SUGESTÕES | 71 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 72 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mercado mundial de enzimas com aplicações industriais no período de 2008-2015. | 21 |
| Figura 2. Reações químicas catalisadas por lipases. | 23 |
| Figura 3. Estrutura Tridimensional da CAL B. | 24 |
| Figura 4. Classificação dos métodos de imobilização usadas para enzimas. | 34 |
| Figura 5. Poliuretano Genérico, reação geral de obtenção. | 38 |
| Figura 6. Esquema representativo das tapas para formação da espuma de PU. | 38 |
| Figura 7. Morfologia das espumas flexíveis convencionais de PU preparadas com adição água. | 39 |
| Figura 8. Sistema de imobilização de enzima por confinamento (inclusão na matriz). | 40 |
| Figura 9. Lipase comercial de <i>Candida antarctica</i> CAL B, Novozymes. | 45 |
| Figura 10. Monômeros usados na elaboração da espuma de PU, (a) póliol e (b) isocianato. | 45 |
| Figura 11. Apresentação esquemática do procedimento de imobilização da lipase CAL B em PU. | 48 |
| Figura 12. Demonstração da metodologia de amostragem da espuma de PU formada com Lipase CAL B, considerando em (a) divisão em duas parcelas (1 e 2) na vertical (vista superior do polímero), (b) visão extrema da divisão em três parcelas (A, B e C) do polímero (c) divisão em três parcelas (A, B e C) na horizontal (vista lateral do polímero). | 49 |
| Figura 13. Metodologia de preparo e acondicionamento da lipase CAL B imobilizada durante o processo da avaliação de ciclos reacionais. | 52 |
| Figura 14. Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros polioliol e isocianato, respectivamente, sendo (a) 95 % e 5 %, (b) 90 % e 10 %, (c) 75 % e 25 %, (d) 65 % e 35 %, (e) 60 % e 40 %, (f) 50 % e 50 %, (g) 25 % e 75 % e (h) 10 e 90 %. | 56 |
| Figura 15. Aspecto da espuma de PU formada juntamente com a lipase Cal B na forma liofilizada, (a) aspecto externo, (b) corte longitudinal. | 58 |
| Figura 16. Aspecto da espuma de PU formada juntamente com a lipase Cal B na forma líquida (EH) sendo (a) Imobilizado na forma íntegra (b) Corte longitudinal do imobilizado (c) Imobilizado triturado. | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Estabilidade da Lipase (CAL B) livre (EH) submetida a temperaturas de 40 °C (EL_40 °C), 60 °C (EL_60 °C) e 80 °C (EL_80 °C). | 62 |
| Figura 18. Estabilidade da Lipase Cal B imobilizada submetida a temperatura ambiente (ASA-25 °C) e de geladeira (ASG-(2-8 °C)). | 63 |
| Figura 19. Estabilidade da Lipase (CAL B) imobilizada submetida a temperatura..... | 64 |
| AS_40 °C, AS_60 °C e AS_80 °C. | 64 |
| Figura 20. Estabilidade da Lipase (CAL B) imobilizada imersa ao meio reacional submetida a temperatura (AM_ 40°C, 60°C e 80°C) no decorrer nos dias de estocagem. | 65 |
| Figura 21. Comportamento da Lipase (CAL B) imobilizada submetida à ciclos e a diferentes temperaturas de armazenagem ambiente (RMRA), geladeira (RMRG 2-8 °C) e 40 °C (RMR_40 °C). | 66 |
| Figura 22. Comportamento da Lipase (CAL B) imobilizada submetida à ciclos e a diferentes temperaturas de armazenagem ambiente (RLETA), geladeira (RLETG 2-8°C) e 40 °C (RLET_40 °C). | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2. Aplicações industriais de lipases. | 26 |
| Tabela 3. Aplicações industriais de lipases <i>Candida antarctica</i> | 29 |
| Tabela 4. Fatores que influenciam no desempenho de um sistema de enzima imobilizada. | 30 |
| Tabela 5. Principais vantagens e desvantagens na utilização de enzimas imobilizadas. | 31 |
| Tabela 6. Diferentes suportes e aplicações da lipase CAL B. | 42 |
| Tabela 7. Descrição das concentrações dos monômeros avaliadas para formação da espuma de PU. | 47 |
| Tabela 8. Resultados obtidos em termos de atividade de esterificação obtidas nas diferentes regiões da espuma com a lipase CAL B liofilizada imobilizada. | 58 |
| Tabela 9. Atividade enzimática obtidas nas diferentes regiões da espuma com a lipase CAL B imobilizada, previamente diluída em água (EH). | 60 |
| Tabela 10. Atividade inicial da CAL B livre (EH) e imobilizada em PU | 62 |
| Tabela 12. Conversões reacionais obtidos nas reações catalisadas pela CALB imobilizada em PU na esterificação de geraniol com ácido oleico e propiônico do ácido oléico e etanol. | 68 |

LISTA DE ABREVEIATURAS E SIGLAS

PU - Poliuretano

CAL B - Lipase *Candida antarctica* tipo B

EE - Enzima em etanol

EA - Enzima em acetona

EH - Enzima em água

ELA - Enzima livre ambiente

ELG - Enzima livre em geladeira (2-8 °C)

EL_40 °C - Temperatura de 40 °C

EL_60 °C - Temperatura de 60 °C

EL_80 °C - Temperatura de 80 °C

AS - Armazenada a seco

ASA - Armazenada a seco na temperatura ambiente

ASG - Armazenada a seco na geladeira (2-8 °C)

AS_40 °C - Armazenada a seco na temperatura de 40 °C

AS_60 °C - Armazenada a seco na temperatura de 60 °C

AS_80 °C - Armazenada a seco na temperatura de 80 °C

AMR_40 °C - Armazenada meio reacional a temperatura de 40 °C

AMR_60 °C - Armazenada meio reacional a temperatura de 60 °C

AMR_80 °C - Armazenada meio reacional a temperatura de 80 °C

AMR - Armazenada em meio reacional

RMRA - Reciclo meio reacional armazenada a temperatura ambiente

RMRG - Reciclo meio reacional armazenada a temperatura de geladeira (2-8 °C)

RMR_40 °C - Reciclo meio reacional armazenada a seco em temperatura de 40 °C

RME - Reciclo meio Etanol

RLETA - Reciclo meio reacional armazenada a seco temperatura ambiente

RLETG - Reciclo meio reacional armazenada a seco temperatura de geladeira (2-8 °C)

RLET_40 °C - Reciclo meio reacional armazenada a seco temperatura de 40°C

RFBA - Filtração - bomba à vacuo

1 INTRODUÇÃO

O aumento da preocupação com questões ambientais, qualidade do produto e redução de gastos em setores industriais, alavancou o interesse pelo uso de enzimas. A tecnologia enzimática é uma alternativa que visa substituir os processos químicos, uma vez que os biocatalisadores envolvem processos com menor impacto ambiental e são mais específicos, apresentando-se como uma ferramenta promissora para síntese de compostos de alto valor agregado (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases constituem um grupo importante de biocatalisadores devido a características de obtenção, alta seletividade e por possibilitar uma tecnologia de grande importância biotecnológica, econômico e industrial de baixo impacto ao meio ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Ainda ressalta-se a capacidade das lipases em catalisar reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado, resultando em amplo potencial de aplicação, relacionado à sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e possuir quimio-regio e em antiosseletividade (KRIEGER *et al.*, 2004; KAPOOR *et al.*, 2012).

As lipases representam uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de uma grande gama de produtos, entre eles os monoglicerídeos, ácidos graxos, agentes biotensoativos, compostos de aroma e sabor e lipídios estruturados ou modificado, entre outros (TREICHEL *et al.*, 2010). Assim, o potencial de aplicações industriais dessas enzimas abrange além da indústria de alimentos a química fina, de detergentes, o tratamento de efluentes, indústria de couro, além da farmacêutica e da área médica. Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das lipases e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional (KAPOOR *et al.*, 2012).

A imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, possibilitando produzir biocatalisadores mais estáveis e com boa especificidade ao substrato, eliminando assim, algumas restrições do uso das enzimas em processos industriais (ZANIN *et al.*, 2004a). A escolha de um biocatalizador imobilizado está relacionada com a possibilidade de aplicação, atividade catalítica, viabilidade de operação contínua do processo, maior facilidade de controle e de separação do produto final, além do aumento de estabilidade ao meio reacional, pH e à temperatura, entre outros (MENDES *et al.*, 2011).

Tendo em vista às vantagens da utilização de enzimas imobilizadas e ao potencial de aplicação destas, como biocatalisadores em reações de interesse têm-se a consolidação da proposta deste trabalho. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a imobilização da lipase de *Candida antarctica* do tipo B (Novozymes) em poliuretano (PU), verificando a concentração dos monômeros que resulte em um suporte apropriado, a solubilidade da enzima no estrutura do suporte, bem como a estabilidade da enzima imobilizada. Ainda verificar a possível aplicação do biocatalizador imobilizado em reações de síntese assim
deste em reação de síntese do etil oleato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte da imobilização de lipases, bem como sua aplicação em reações de interesse. Com base no exposto e levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada à lipase comercial obtida de *Candida antarctica* tipo B e sobre os suportes e métodos usados para imobilização de enzimas. Resultados da literatura concernentes aos obtidos nesta pesquisa apresentarão especial destaque.

2.1 ENZIMAS

Desde os primórdios da civilização, o homem vem explorando de forma natural a utilização de enzimas para a produção de alimentos e bebidas. A evolução dos conhecimentos técnicos e científicos propiciou a utilização de enzimas em diversos ramos de atuação da atividade humana (WANDERLEY *et al.*, 2011). Em 1833, Johan Kjeldahl desenvolveu o método analítico para determinação da proteína em alimentos o qual se tornou a base para o desenvolvimento da enzimologia quantitativa e biotecnologia geral. O conhecimento consolidado após o isolamento da pepsina do estômago (PARIZA *et al.*, 2002; ALVARENGA, 2011).

Em meados de 1876, William Kuhne propôs a utilização do termo enzima (PARIZA *et al.*, 2002) e em 1894, Emil Fisher propôs o modelo “chave e fechadura”. A partir de 1926 James Sumner postulou que toda enzima é uma proteína, proporcionando um grande avanço nos estudos que envolvem enzimas (MENDES *et al.*, 2011). Essa premissa permaneceu controversa durante algum tempo até o Prêmio Nobel da Química em 1946 (NOBEL, 1946; SIRKO *et al.*, 2008).

Desta forma, os estudos relacionados a enzimas evoluíram gradativamente acompanhando a demanda do mercado e assim, foram sendo definidos importantes conceitos para a determinação da eficiência e/ou a respeito do comportamento das enzimas nos meios reacionais. Neste sentido, ressaltam-se as definições sobre a velocidade de reação, a qual é diretamente proporcional à concentração de enzimas presentes no meio.

Quando a concentração da enzima é constante e ocorre um aumento na concentração dos substratos há elevações cada vez menores na velocidade da reação (VOET *et al.*, 2006).

Alguns fatores inibidores de reação catalisado por enzimas devem ser considerados, entre estes a concentração de enzima, a influência do pH (faixa de pH ótimo) e efeito da temperatura (estabilidade da proteína) (PATACAS, 2007).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações, sendo considerados catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (CARVALHO *et al.*, 2003).

As enzimas são biocatalisadores de natureza protéica ou glicoprotéica atuam em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C), pH e pressão, atingindo taxas de reação bastantes elevadas (podem elevar a taxa de uma reação de 108 a 1.012 vezes). Este comportamento pode resultar em uma redução dos custos do processo, já que sua elevada especificidade resulta em um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis e redução na quantidade de resíduos (CASTRO *et al.*, 2004).

Com base nessas vantagens, houve um aumento significativo na produção e comercialização de enzimas em geral. De acordo com a reportagem da Business Communications Company Inc. para 2015, o mercado global de enzimas esta estimado em U\$ 4,4 bilhões de dólares. Este fato esta baseado no surgimento de novas aplicações utilizando enzimas no setor industrial, exigindo desta forma que a indústria responda com um fluxo contínuo de produtos inovadores (RESEARCH, 2011)

Atualmente aproximadamente 200 tipos de enzimas provenientes de bactérias, fungos filamentosos e leveduras são comercializados (SHARMA *et al.* 2001; CASTRO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2009). As mesmas são classificadas pela União Internacional de Bioquímica que estabeleceu a “Comissão de Nomenclatura e Classificação de Enzimas”, conforme apresentado na Tabela 1 (CASTRO *et al.*, 1995; KIELING *et al.*, 2002; NELSON *et al.*, 2002; QUEIROZ, 2002; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

O emprego destas em processos industriais tem um grande potencial devido a sua eficiência, pois executam uma série de transformações de modo seletivo e rápido, sendo bastante ativa e versátil (PATEL *et al.*, 2002).

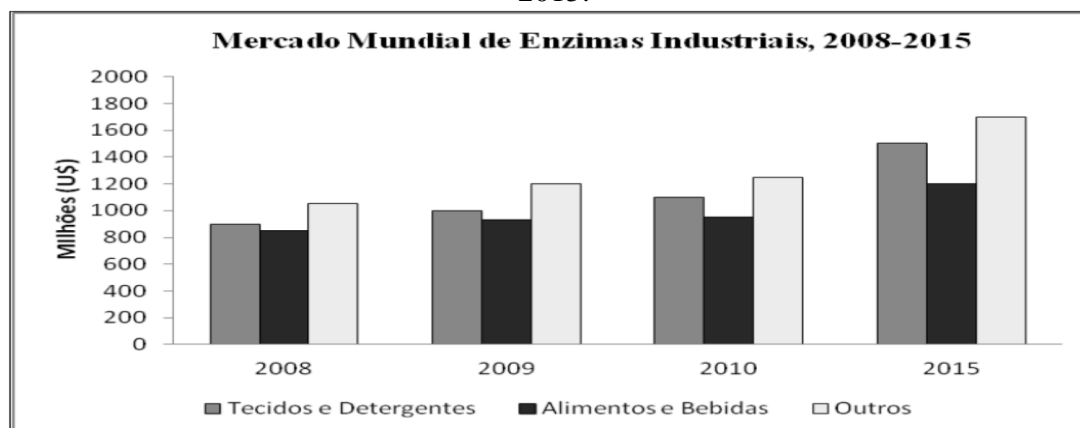
Tabela 1. Classificação de enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

| Classe de Enzimas | Algumas Subclasses | Reações catalisadas pelas enzimas |
|-------------------|--------------------------------------|---|
| Oxidoreductase | hidrogenase oxidase peroxidase | Reação de oxidação–redução ou transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de hidrogênio) atuando em -CH-OH, -C=O, -C=O-, CH-NH-, NADH e NADPH. |
| Transferase | transaldolase stranscetolase | Reação de transferência de grupos funcionais entre moléculas. Grupos em 1C, aldeído ou cetona, acil, glicosil, fosfatos e enxofre. |
| Hidrolase | esterase lipase peptidase | Reações de hidrólise (ésteres, ligações glicosídicas, peptídicas, outras ligações C-N e anidridosácidos). Transferência de grupos funcionais para a água. |
| Liase | descarboxilas ecetoacidolia se | Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de molécula de água, amônia e gás carbônico (=C=C=, =C=O, =C=N-). |
| Isomerase | racemase epimerase mutase | Transferência e grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros. |
| Ligase | sintetase | Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes a custa de energia (C-O, C-S, C-N,C-C). |

FONTE: PATEL *et al.*, 2002.

A Figura 1 apresenta a evolução do mercado mundial de enzimas a partir do ano de 2008 em relação ao custo de utilização desta tecnologia, sendo efetuada uma estimativa da sua expansão até o ano de 2015. Verifica-se que para o mercado de alimentos e bebidas o custo de utilização é menos expressivo do que o de tecidos e detergentes (RESEARCH, 2011).

Figura 1. Mercado mundial de enzimas com aplicações industriais no período de 2008-2015.



FONTE: RESEARCH, 2011.

Estes indicadores ressaltam a importância de pesquisas na área de tecnologias enzimáticas a serem empregadas em alimentos, buscando aumentar a acessibilidade a estas, devido às vantagens que podem ser desenvolvidas em biocatalisadores específicos a este segmento (RESEARCH, 2011).

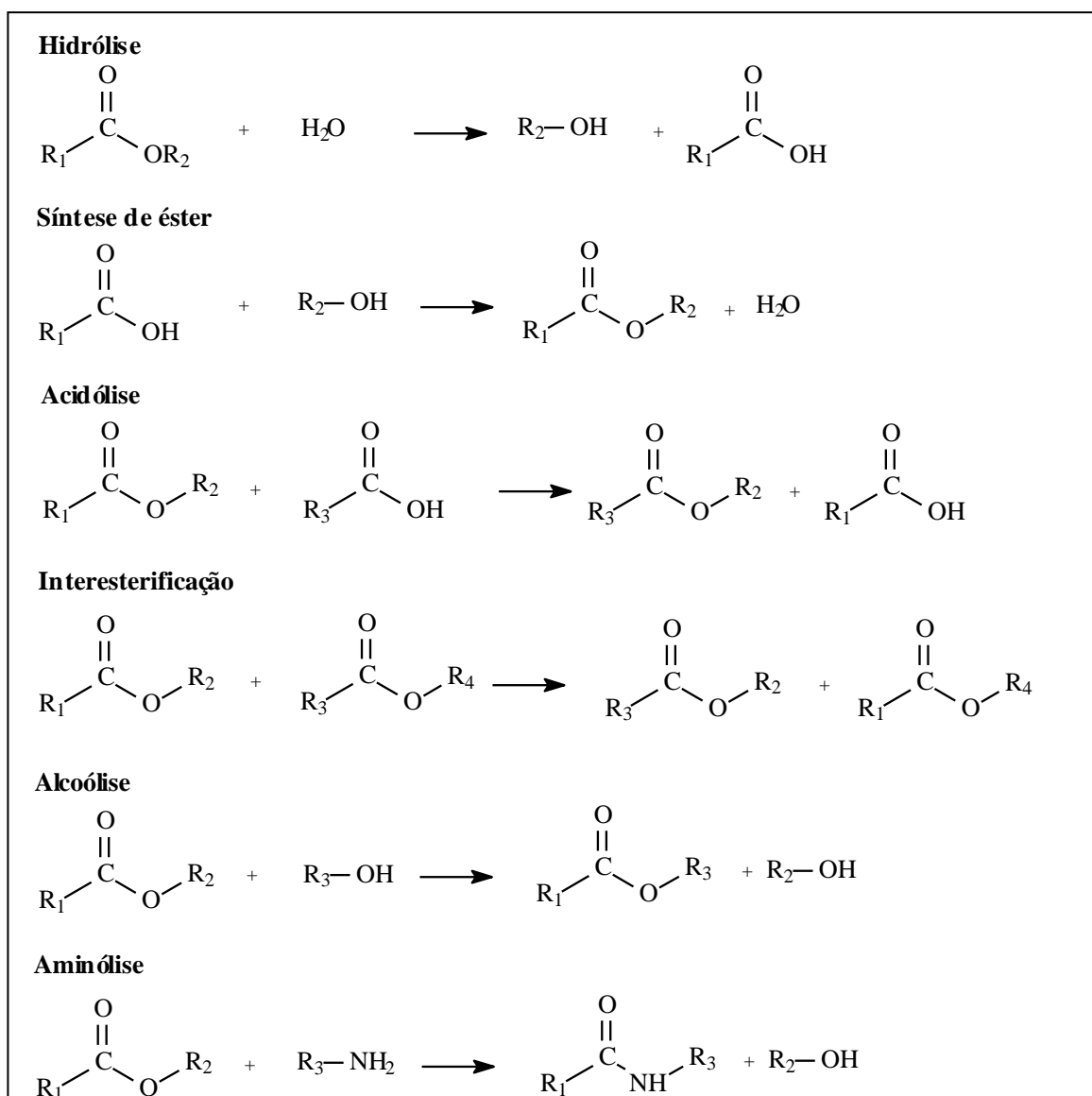
2.1.1 Lipases

No imenso universo das enzimas destacam-se as lipases (E.C.3.1.1.3) definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, que atuam na interface orgânico-aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxílicas de triacilgliceróis a fim de liberar ácidos orgânicos e glicerol. A relação entre as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) normalmente são controladas pelo conteúdo de água do meio reacional (CARVALHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004).

Assim, dependendo do substrato da reação, esta também pode ser chamada de reação de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise (FURIGO, 2000; SHARMA *et al.*, 2001; JAEGER *et al.*, 2002; KAMBOUROVA *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 2003; HASAN *et al.*, 2004; MARTINS, *et al.*, 2008; MACHADO, 2011). A Figura 2 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

Cabe ressaltar dentre os aspectos estruturais da lipase um em específico, a presença de uma tampa ou válvula, composta de uma ou duas sequências peptídicas em α hélice, que cobre o sítio ativo. Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo acessível ao substrato. Ao mesmo tempo em que o centro ativo fica acessível, uma larga superfície hidrofóbica é exposta, facilitando a ligação da lipase à interface (PAIVA *et al.*, 2000; EMSLEY, 2001).

A ação das lipases é, geralmente, descrita pelo mecanismo cinético ping-pong bi bi. Este mecanismo consiste de duas etapas principais: o ataque nucleofílico na ligação éster do substrato pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxil do resíduo serina do sítio ativo após a abertura da tampa (resultando na formação de complexo enzimático acilado e o desprendimento de espécie álcool do substrato original) e a hidrólise do complexo enzimático acilado, resultando na regeneração da enzima (JAEGER *et al.*, 1999; PAIVA *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2009).

Figura 2. Reações químicas catalisadas por lipases.

FONTE: PAQUES *et al.*, 2006.

Dependendo da fonte, as lipases isoladas ou purificadas possuem um número de propriedades que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação, tais como alta eficiência catalítica (podem elevar a velocidade de uma reação de 10^8 a 10^{12} vezes); massa molar variando entre 20 a 75 KDa; seletividade; atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C) e em pressão atmosférica (CASTRO *et al.*, 2004).

São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, porém os micro-organismos são a fonte preferida, uma vez que são produzidas com altos rendimentos e produtividades, possuem grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (MARTINS *et al.*, 2008).

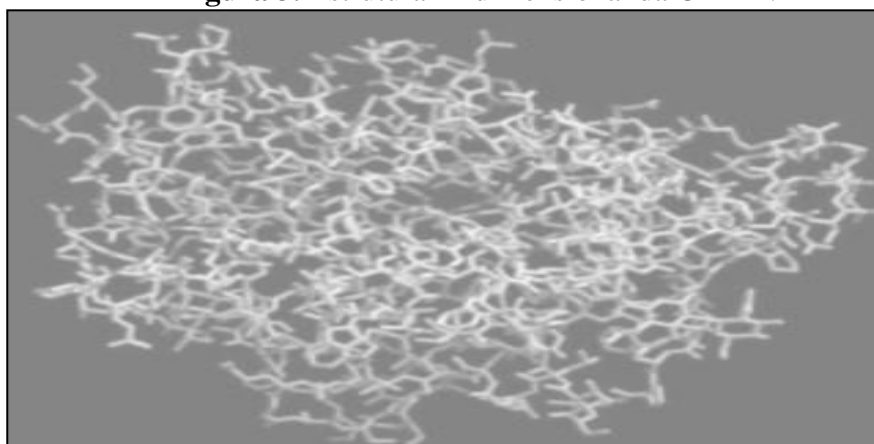
Lipases de diferentes origens se encontram disponíveis atualmente no mercado e, desde 1979, já ocorre o emprego em larga escala de lipases como catalisadores de processos, entretanto, os avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocarem no mercado lipases microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível (VULFSON, 1994; SHARMA *et al.*, 2001; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2011).

O mercado mundial de enzimas foi estimado em cerca de US\$ 4 bilhões por ano (SARROUH *et al.*, 2012). Cerca de 90% da produção anual provém das maiores empresas produtoras de enzimas, como Novozymes, com sede na Dinamarca; Gist Brocades, na Holanda; Amano, no Japão; Solvay, Pfizer e Genencor, nos Estados Unidos (SHANLEY, 1998; CASTRO *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006).

2.1.1.1 Lipase de *Candida antarctica* tipo B

A lipase de *Candida antarctica* (CAL), particularmente a B, tem sido amplamente investigada, pois é produzida por uma levedura extremófila, adaptada a temperaturas baixas, e considerando que inúmeros pesquisadores buscam o aperfeiçoamento da estabilidade térmica de sua lipase, esta característica pode resultar em uma vantagem no momento de sua aplicação industrial (KOSE, 2002; MCCABE *et al.*, 2002; OTTOSON *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 2007; SUEN *et al.*, 2004; QIAN *et al.*, 2005; MAGNUSSON *et al.*, 2005; SIDDIQUI *et al.*, 2005; LOCK, 2007). Sua estrutura foi elucidada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura Tridimensional da CAL B.



FONTE: (www.novozimes.com).

Assim, pesquisadores têm mostrado interesse na lipase de *Candida antarctica*, devido a suas propriedades, como a termoestabilidade e a estabilidade em pHs ácidos (UPPENBERG *et al.*, 1994; MARÍA *et al.*, 2005). A mesma apresenta uma característica peculiar em seu sítio catalítico, permitindo catalisar diferentes reações químicas, ampliando suas possibilidades de uso (FABER, 1997; KWON *et al.*, 2007). A lipase CAL B é comercializada na forma solúvel, liofilizada ou imobilizada, por empresas como: Novo Nordisk, Novozimes, Boehringer Mannheim e Roche Diagnostics (FORESTI *et al.*, 2005).

2.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIPASES

Os setores industriais que mais se utilizam de lipases para geração de bens de consumo são: o de formulação de detergentes (KIRK *et al.*, 2002), indústria de laticínios, setores têxteis, síntese farmacêuticas e médicas na produção de biossensores em análises clínicas (WINKLER *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999; LAYER *et al.*, 2001), HASAN *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006), degradação de óleos e gorduras (VULFSON, 1994; MENDES *et al.*, 2005), produção de cosméticos (SVENDSEN *et al.*, 2008), tratamento de efluentes (SHARMA *et al.*, 2001; ABDELMAJEED *et al.*, 2012) e produção de biodiesel (MARTINS *et al.*, 2008; WANDERLEY *et al.*, 2011), kits para diagnósticos de alimentos (LEE *et al.*, 2008; BÓDALO *et al.*, 2009; MACHADO, 2011) entre outras.

Para a escolha da enzima “ideal” é necessário uma cuidadosa investigação sobre os fatores que influenciam a sua aplicação e em quais processos industriais deve ser aplicadas. Esta definição repercute na necessidade de estudos quanto ao uso de lípases, principalmente em aplicações industriais de larga escala, em virtude de suas características peculiares, principalmente sua acessibilidade, ou seja, de fácil produção, baixo custo de geração, não requerimento de cofatores, e aplicabilidade, ou seja, operação em condições brandas de temperatura e pH, minimização de problemas de isomerização, racemização e rearranjo e estabilidade à solventes orgânicos (CASTILHO *et al.*, 2003). Exemplos de aplicações industriais de lipase em função do tipo de reação catalisada podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Aplicações industriais de lipases.

| Área Industrial | Aplicação | Fonte | Referência |
|-------------------------|--|---|--|
| Alimentação | hidrólise da gordura do leite; melhoria do sabor e cura de queijos; manufatura de produtos; lipólise da manteiga e creme. | <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> <i>Mucor miehei</i> . | PEREIRA, 2001; SAID <i>et al.</i> , 2004; WANDERLEY <i>et al.</i> , 2011; ABDELMAJEED, 2012. |
| | fabricação de pães; aumento no volume, textura; emulsificante, maciez e aumento vida de prateleira. | várias fontes. | CASTRO <i>et al.</i> , 2004; GÓMEZ <i>et al.</i> , 2004. |
| | produção do emulsificante ricinoleato de poliglicero como suplemento na alimentação de não-ruminantes; tratamento de resíduos gordurosos de indústrias de ração animal | várias fontes. | JEGANATHAN, 2007; BÓDALO <i>et al.</i> , 2009; |
| | forma de biossensores; ácidos graxos livres e triacilgliceróis em óleos e azeites. | várias fontes. | REJEB <i>et al.</i> , 2007. |
| | desacetilação da quitosana (incorporação de antioxidantes em óleos); produção de oligossacarídeos. | várias fontes. | SENANAYAKE <i>et al.</i> , 2004; LEE <i>et al.</i> , 2008. |
| | hidrólise enzimática parcial/seletiva de óleos e gorduras; obtenção de ácidos graxos essenciais (ácido linoleico). | várias fontes. | MALCATA <i>et al.</i> , 1990a; CARVALHO <i>et al.</i> , 2003. |
| | produção de butil acetato pela reação de esterificação (butanol e ácido acético). | <i>Rhizopus oryzae</i> . | SALAH <i>et al.</i> , 2007. |
| Papel e Celulose | remoção dos componentes hidrofóbicos (triacilglicerídeos e ceras); fabricação do papel. | várias fontes. | JAEGER <i>et al.</i> , 1998. |
| Química | pré tratamento enzimático de efluentes (abatedouros; indústria de laticínios; frigoríficos). | várias fontes. | JAEGER <i>et al.</i> , 1998; SHARMA <i>et al.</i> , 2001; GULATI, 2005. |
| | catalisam a reação de hidrólise triacilgliceróis; remoção de óleos e gorduras | várias fontes. | MENDES <i>et al.</i> , 2005. |
| | óleo de buriti (obtenção de β -Caroteno) | várias fontes. | RIBEIRO, 2008. |
| Farmacêutico | agentes terapêuticos; hidrólise proteolítica; tratamento de insuficiência pancreática exócrina; | várias fontes. | LAYER <i>et al.</i> , 2001; LAYER <i>et al.</i> , 2003; SVENDSEN <i>et al.</i> , 2008. |

Cont.

| | | | |
|--|---|-------------------|---|
| | distúrbios gastrintestinais e hiperuricosúria resistentes à hidrólise por proteases digestivas. | | |
| | produção de lactonas sintéticas; atividade citotóxica (células de melanoma e de tumor de cólon). | várias fontes . | LONGO <i>et al.</i> , 2007. |
| Detergentes | hidrolisar gorduras; estabilidade a compostos das fórmulas dos detergentes (benzeno sulfonatos e protease); substituição de polissulfatos, biodegradabilidade e redução dos impactos ambientais. | várias fontes . | SHARMA <i>et al.</i> , 2001; HASAN <i>et al.</i> , 2006. |
| Síntese de Ésteres de Ácidos Graxos | síntese orgânica de ésteres de ácidos graxos, (propriedades surfactantes); triacilgliceróis; fosfolipídios; esteroides; aromatizantes; fragrâncias; emulsificantes; agentes antibacterianos (aditivos alimentares). | . várias fontes . | CARLI, 2006; MARÓSTICA, 2006; PAULA <i>et al.</i> , 2008. |
| | esterificação e transesterificação (solventes orgânicos); produção flavorizantes (butil acetato); monoacilgliceróis (oleína de palma); emulsificantes (alimentos, farmacêutica e cosmético). | várias fontes | TINCOM, 2003; CASTRO <i>et al.</i> , 2004; SALAH <i>et al.</i> , 2007; H-KITTIKUN <i>et al.</i> , 2008. |
| Biodiesel | melhor viscosidade e densidade específica; óleos vegetais modificados (transesterificação); alternativa de combustível (biodiesel). | várias fontes | TIANWEI <i>et al.</i> , 2010; LI <i>et al.</i> , 2007; TAMALAMPUDI <i>et al.</i> , 2008; MORENO-PIRAJÀN <i>et al.</i> , 2011. |

A escolha do uso de agentes ativadores ou inibidores dependem da aplicação e da relação custo/ benefício gerado, e representando um custo adicional ao processo. Os custos estão relacionados a múltiplos fatores como os processos de produção, se permite ou não a recuperação enzimática, e o estado de pureza em que está sendo vendida. Quanto mais purificada estiver à enzima, maior custo ela terá. No entanto, reações secundárias presentes em enzimas parcialmente purificadas, que comprometem o produto final, serão minimizadas (SAID *et al.*, 2004).

A Importância Industrial de Ésteres de Ácidos Graxos

Os ésteres são importantes compostos orgânicos com um número crescente de aplicações comerciais. Estes compostos são amplamente utilizados para a preparação de compostos aromáticos, cosméticos, detergentes, sabores e produtos farmacêuticos.

Os ésteres também podem ser utilizados como plastificantes e lubrificantes. O oleato de etila é utilizado, por exemplo, como aditivo biológico, plastificante e fluido hidráulico. Os ésteres obtidos a partir de fontes naturais não encontram-se disponíveis em grandes quantidades, e são normalmente demasiado caro para serem utilizados em aplicações comerciais (MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Portanto, muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses enzimáticas. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido especial atenção devido às condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza dos produtos alcançados, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (ALVAREZ-MACARIE *et al.*, 2000; MARTÍNEZ *et al.*, 2004; ADACHI *et al.*, 2005).

Os ésteres podem ser obtidos através de diferentes metodologias:

- reação entre álcoois e ácidos carboxílicos (esterificação) com a eliminação de água;
- reações de interesterificação, onde ocorrem trocas de grupos acilas entre ésteres e ácidos carboxílicos (acidólise), entre ésteres e álcoois (alcoólise) ou gliceróis (glicerólise) e entre ésteres (transesterificação);
- através de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados ou por processos químicos e, mais recentemente, por biocatálise.

Os processos enzimáticos apresentam inúmeras vantagens em relação aos processos químicos industriais. Por isso, a síntese enzimática do oleato de etila e de outros ésteres do ácido oleico em solventes orgânicos têm sido estudada utilizando-se lipases de pâncreas de porco e de várias fontes microbianas, como as de *Mucor miehei*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus oligosporus*, *R. delemar*, *R. arrhizus*, *Candida rugosa*, *Penicillium simplicissimum* e *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*) (FERREIRA, 2005; FORESTI *et al.*, 2005; MARÍA *et al.* 2005; BUCALÁ *et al.*, 2006).

Os produtos resultantes de ácidos e álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são importantes componentes de aromas e flavorizantes utilizados nas

indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Já os produtos de esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) com álcoois de cadeia longa são utilizados como lubrificantes e plastificantes em máquinas de alta precisão.

Os ésteres resultantes das reações entre ácidos de cadeia longa com álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são utilizados nas indústrias como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e em medicamentos (HAZARIKA *et al.*, 2002; MARÍA *et al.*, 2005; BUCALÁ *et al.*, 2006;). Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes para a indústria alimentar, farmacêutica e cosmética; o palmitato de isopropila é usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto através da pele. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel (HAZARIKA *et al.*, 2002).

2.2.1 Aplicação da Lipase de *Candida antarctica* tipo B

A lipase CAL B está comercialmente disponível em várias formulações para aplicações em reações tanto em solventes orgânicos quanto em meio aquoso. As aplicações em processos industriais citadas na literatura são apresentadas na Tabela 3.

Estas formulações são bastante ativas mesmo em baixa atividade de água e podem tolerar solventes relativamente polares como a acetonitrila (ROTTICCI, 2000). Muito tem sido publicado sobre o uso de lípases, como a CAL B, para catalisar biotransformações, muitas dessas reações são realizadas em meios não aquosos (VENTURA *et al.*, 2011).

Tabela 3. Aplicações industriais de lipases *Candida antarctica*.

| Área Industrial | Aplicação | Referencia |
|-------------------------------------|--|--|
| Indústrias de cosméticos e fármacos | síntese de compostos ativos; de oleato de cetila; de butirato de butil em meios orgânicos. | SVENDSEN <i>et al.</i> , 2008; LONGO <i>et al.</i> , 2007; ARROYO <i>et al.</i> , 2000; LOZANO <i>et al.</i> , 2002. |
| Indústria alimentos | síntese de ésteres de aromas; de lactato de butila; vitaminas; de açúcares (glicidol). | VILLENEUVE <i>et al.</i> , 2007; ZHANG <i>et al.</i> , 2007; MELLOU <i>et al.</i> , 2006; KATSOURA <i>et al.</i> , 2006; LUE <i>et al.</i> , 2008. |
| Indústria de biodiesel | óleos vegetais modificados (transesterificação) | SHIMADA <i>et al.</i> , 2007; SAMUKAWA <i>et al.</i> , 2000. |

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula em um suporte (CARDOSO *et al.*, 2009). Mais especificamente, a imobilização enzimática mantém o biocatalisador fisicamente confinado ou localizado em uma região do suporte, mantendo sua atividade catalítica e possibilitando sua utilização repetida e continuamente (CHIBATA *et al.*, 1978; GROSOVÁ *et al.*, 2008). Na Tabela 4 podem ser verificados os fatores que influenciam no desempenho de um sistema de enzima imobilizada (TISCHER *et al.*, 1999a).

Tabela 4. Fatores que influenciam no desempenho de um sistema de enzima imobilizada.

| | Propriedades Bioquímicas | | Parametros Cinéticos | |
|----------------|--|--|---|--|
| Enzima | Massa molecular, grupos funcionais da superfície proteica, (funções de inativação ou proteção das impurezas). | | Atividade específica de pH e temperatura, parametros cineticos de ativação e inibição, estabilidade térmica, pH e solventes, contaminantes e impurezas. | |
| Suporte | Características Químicas | | Características Mecânicas | |
| | Composição e base química, grupos funcionais, estabilidade química da superfície do suporte, tais como: os micro-efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica hidrofílica, efeito redutor e presença de ions metalicos). | | Diâmetro do poro, comportamento de copreensão, tamanho de partícula; área superficial, volume acessível da matriz, resistência a em operações em altas vazões para reatores de leito fixo, reatores e sedimentação para leitos fluidizados. | |
| | Metodo de Imobilização | | Estabilidade | |
| | Fixação de proteína, eficiência da enzima ativa, parametros cineticos intrínsecos | | Operacional (expressa em tempo de meia vida), estabilidade de estocagem. | |
| | Efeitos de transferência de massa | | Desempenho | |
| | Partição (diferentes concentrações de soluto no catalizador), difusão interna (poros) externo. | | Produtividade (produto formado por unidade de atividade ou massa de enzima (e.g. unidade). | |

FONTE: TISCHER *et al.*, 1999b.

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, sua utilização em processos industriais tem sido limitada. Isto se deve,

principalmente, à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e à dificuldade de separação do produto final, impedindo assim o seu uso em processos contínuos. Com a finalidade de aproveitar essas vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, têm-se estudado métodos para tornar enzimas insolúveis ao meio reacional, resultando nas técnicas de imobilização enzimática (LADERO *et al.*, 2002; ZANIN *et al.*, 2004a; ALMEIDA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2010).

O estudo de enzimas imobilizadas teve início no século XX, quando da observação de que carvão ativo, ao qual havia sido adicionada solução com atividade invertásica. Mesmo após lavagens sucessivas o carvão mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose (CASTRO *et al.*, 2008). A partir de então, passou-se a investigar como aperfeiçoar as condições de imobilização, a fim de poder utilizar esta técnica em diferentes aplicações.

As transformações moleculares que podem ocorrer nas enzimas e suportes durante o processo de imobilização, devendo ser considerado a possibilidade de alterações nas propriedades químicas e físicas das enzimas, principalmente após a imobilização (KENNEDY *et al.*, 1987; SHELDON, 2007).

2.3.1 Vantagens das e Desvantagens das Técnicas de Imobilização

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens e desvantagens na utilização de enzimas imobilizadas são a facilidade do desenvolvimento de processos em escala comercial ou de causar alguns efeitos sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas, a especificidade e o deslocamento dos valores de pH e temperatura.

Tabela 5. Principais vantagens e desvantagens na utilização de enzimas imobilizadas.

| Vantagens | Desvantagens |
|--|--|
| Facilidade de separação dos produtos | Conformacionais |
| Quando elevado grau de pureza é determinado no processo, recomenda-se o uso de enzimas imobilizadas por possuir técnicas unitárias de separação simples. | Modificação e alteração na estrutura terciária do sítio ativo. |
| Facilidade de recuperação do biocatalisador | Esterioquímicos |
| Utilização de biocatalisadores imobilizados facilita as etapas de purificação (<i>downstream</i>), as técnicas empregadas | Onde uma parte da molécula da enzima é imobilizada em posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível; |

Cont.

| | |
|--|--|
| <p>passam a serem unitárias simples (filtração ou centrifugação), a realização de procedimentos de inativação enzimática (desnaturação térmica ou por pH), alterando o produto final resultando em economia nos processos industriais.</p> | |
| <p>Processo operado continuamente</p> | <p>Partição</p> |
| <p>Além de reduzir o volume reacional, a enzima pode ser utilizada em maior concentração e facilitar o controle do processo na utilização de biocatalisadores imobilizados.</p> | <p>Podem surgir interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e moléculas de baixa massa molecular presente na solução, leva a uma modificação microambiente.</p> |
| <p>Manutenção de micro-ambiente com elevada atividade de água.</p> | |
| <p>A imobilização permite a manutenção de uma camada de solvatação no micro-ambiente em torno da enzima capaz de manter uma dinâmica molecular mínima, essencial à atividade enzimática em ambientes orgânicos.</p> | <p>A enzima ligada ao suporte sofre limitações de difusão e transferência de massa, onde o substrato se difundiu a solução e acessa o centro catalítico da enzima imobilizada, quando a difusão é menor, ocorre a queda na concentração de produtos.</p> |
| <p>Estabilização da enzima.</p> | <p>Transferência de massa</p> |
| <p>A imobilização da enzima em diferentes suportes pode aumentar a rigidez da estrutura molecular minimizando a desnaturação por temperatura, pH ou solvente.</p> | <p>Surge a partir da resistência de difusão de solução de substrato para os sítios catalíticos e difusão de produtos.</p> |
| <p>Propriedades enzimáticas podem ser alteradas favoravelmente</p> | |
| <p>A interação entre a enzima e o suporte pode ocasionar mudanças conformacionais na enzima provocando alterações desejadas nas propriedades catalíticas, como por exemplo, o aumento da atividade e estereo especificidade da enzima.</p> | <p>Em relação aos difusionais, são basicamente dois tipos de resistências, as externas que surgem devido ao fato de que o substrato deve ser transportado da solução até a superfície de catálise, atravessando as camadas líquidas e as internas que surgem devido à movimentação do substrato, o no interior do meio catalítico ocorrendo difusão simultaneamente com a reação</p> |
| <p>Custos com manejo de materiais são minimizados</p> | |
| <p>O aumento da estabilidade da enzima imobilizada facilita a sua estocagem e diminui as exigências para sua manipulação.</p> | <p>A difusão é influenciada pela sua natureza física e/ou química do suporte, podendo acarretar uma distribuição desigual do substrato, produto e do sistema imobilizado, do restante da solução. A partição, por exemplo, é o comportamento cinético de uma enzima presa a um suporte carregado, estando suscetível a concentração de espécies químicas (substrato, íons, produto, etc) nas proximidades da enzima, sendo</p> |
| <p>Outras vantagens têm sido descritas nos estudos envolvendo imobilização, como o aumento da atividade da proteína, controle e manipulação da seletividade, desenvolvendo a aplicação de derivados imobilizados em processos industriais.</p> | |

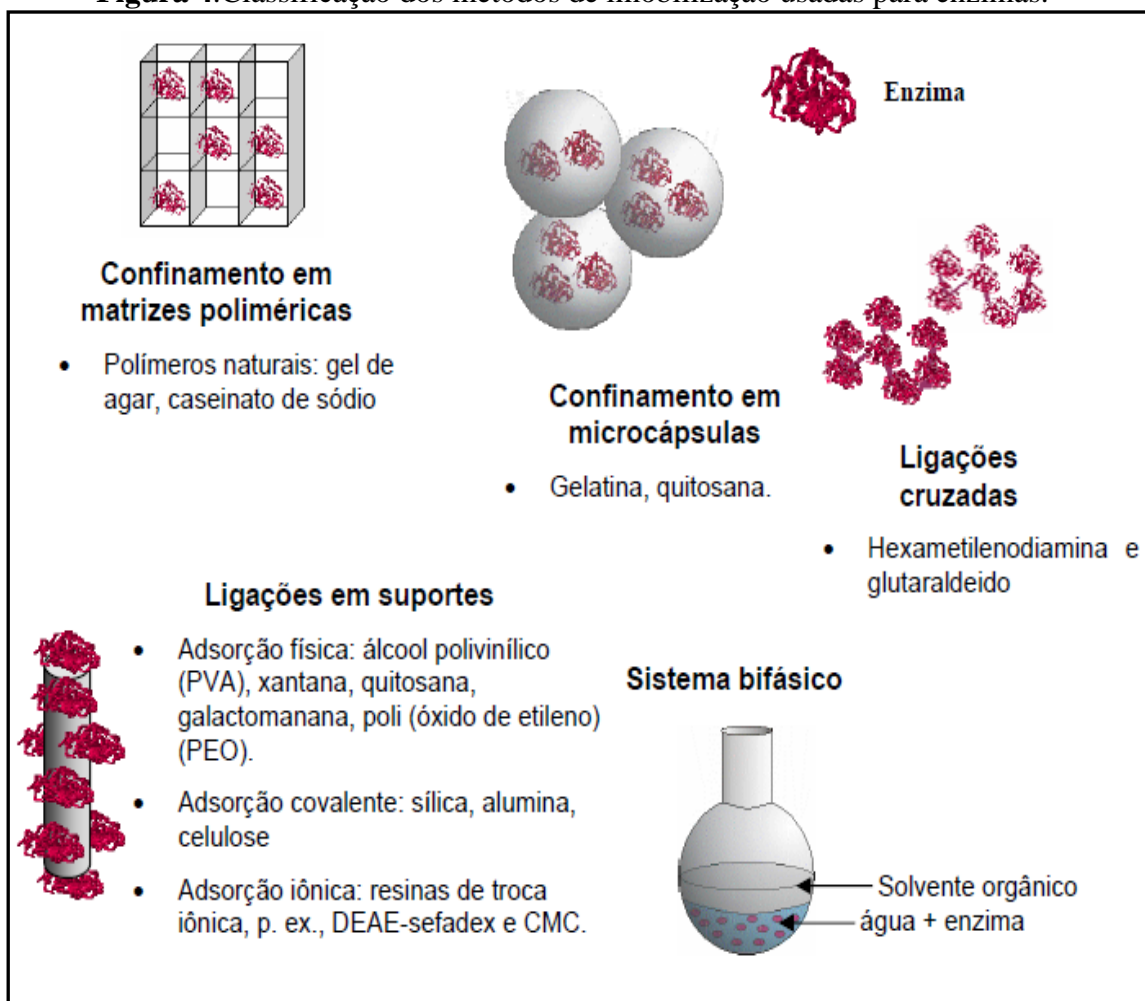
| | diferente do resto da solução |
|--|-------------------------------|
| FONTE: FREIRE <i>et al.</i> , 1990; ILLANES, 1994; JESUS <i>et al.</i> , 1998; TISCHER <i>et al.</i> , 1999a; TISCHER <i>et al.</i> , 1999b; VILLENEUVE <i>et al.</i> , 2000; GUIBAN <i>et al.</i> , 2001; ALBAYRAK <i>et al.</i> , 2002; NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2002; KILINC <i>et al.</i> , 2002; MARKOGLU <i>et al.</i> , 2003; DALLA-VECCHIA <i>et al.</i> , 2004; GÓMEZ, 2005; VITOLO, 2005; BRÍGIDA, 2006; PANDEY <i>et al.</i> , 2006; MATEO <i>et al.</i> , 2007; SZYMANSKA <i>et al.</i> , 2007; BOM <i>et al.</i> , 2008; ARAUJO, 2009; BRADY <i>et al.</i> , 2009; MENDES <i>et al.</i> , 2009; ENRICO, 2012. | |

2.3.2 Métodos de imobilização

Inúmeros métodos de imobilização têm sido descritos na literatura e investigados para contornar os possíveis problemas de instabilidade das enzimas e otimizar suas aplicações (MENDES *et al.*, 2013). Além disso, diferentes técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade às enzimas, facilitar a sua recuperação e reutilização (GARCÍA-ARRAZOLA, *et al.*, 2005; SÉVERAC, 2011; AL-ZUHAIR, 2013).

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (FERNANDES *et al.*, 2000; VILLENEUVE *et al.*, 2000; GUIBAN, 2001; BUNGAY, 2003; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-ADSUAR *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2013).

Diferentes técnicas de imobilização de enzimas podem ser empregadas. Os principais métodos são apresentados na Figura 4.

Figura 4. Classificação dos métodos de imobilização usadas para enzimas.

FONTE: KOURKOUTAS *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-ADSUAR *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2013.

2.3.2.1 Imobilização por Confinamento

O método de imobilização no interior de um suporte consiste na formação de uma matriz porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, e/ou a retenção do biocatalisador por uma membrana porosa. Em ambos os casos, a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Contudo, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzima imobilizada (ROSEVEAR *et al.*, 1989).

Uma vantagem do encapsulamento de enzimas é a grande área superficial de contato entre o substrato e a enzima no interior do suporte. No entanto existem algumas desvantagens que devem ser levadas em consideração, como a possível inativação da

enzima durante o processo de imobilização, possíveis efeitos de inibição por produtos no interior da matriz e a alta concentração de enzima necessária (MARIOTTI, 2000; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2011; DATTA *et al.*, 2012).

O método de encapsulamento inclui o encapsulamento em gel (matriz), em fibras e o microencapsulamento (capsula) sendo as características em cada um dos suportes específicos (MARIOTTI, 2000; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2011).

❖ *Encapsulação em fibras*: ocorre quando a enzima é envolvida nas microcavidades de fibras sintéticas. As vantagens desse método é que as fibras são resistentes a ácidos fracos, a alta força iônica e a alguns solventes orgânicos.

❖ *Encapsulação em gel (matriz)*: este método envolve a retenção da enzima no interior de uma matriz polimérica insolúvel no meio da reação. Este método é baseado na mistura da enzima com um fluido precursor do gel e subsequente gelificação por polimerização ou precipitação, ficando assim a enzima uniformemente distribuída no interior da matriz.

❖ *Microencapsulação (cápsula)*: consiste em aprisionar a enzima em membranas poliméricas semipermeáveis, com grande superfície de contato. É um sistema limitado para substrato com baixa massa molecular, pois este precisa atravessar a membrana para ter acesso à enzima. Há grande vantagem é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando assim, a sua desnaturação. Contudo, há a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana.

2.3.2.2 Imobilização por Ligação

O método de imobilização através da ligação da enzima pode ser dividido em adsorção física e ligação covalente (CAO, 2005a; CAO, 2005b; MATEO *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2008; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; MACHADO, 2011; DRAUZ, 2012; MAGNER, 2013).

❖ *Adsorção física*: o método de adsorção física é o procedimento mais fácil para se preparar um sistema imobilizado. A enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel, que se encontra em meio aquoso, por meio interações de Van der Waals e interações específicas, promovendo pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. A adsorção da enzima é dependente do pH, da natureza do solvente, da força

iônica, da concentração de enzimas e da temperatura, podendo apresentar em alguns casos a dessorção.

❖ *Ligação covalente*: é a mais difundida e estudada, pois há a formação de uma ligação dita ‘forte’ (estável) entre os grupos funcionais presentes na superfície da enzima e do suporte, não permitindo que a molécula de enzima se desprenda do suporte em presença do substrato, não ocorre dessorção. Sua principal desvantagem é que a enzima perdendo atividade impede o reuso do suporte.

❖ *Ligação cruzada*: é um método livre de suporte e as enzimas estão ligadas umas às outras ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa, resultando em uma enzima quase pura, ou seja, um aglomerado de células ou proteínas (enzimas) que se juntam para a formação de unidades maiores sem adição de qualquer agente externo.

2.4 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Apesar do grande número de trabalhos publicados na área de imobilização enzimática, poucos processos são aplicados em escala industrial. Tal fato deve-se ao elevado custo dos suportes e reagentes utilizados no processo de imobilização, baixa eficiência de retenção catalítica da maioria dos processos, baixa estabilidade operacional de muitas enzimas imobilizadas e pouca versatilidade em equipamentos de operação contínua (ZANIN *et al.*, 2004b).

Assim, para que o emprego de enzimas imobilizadas torne-se um processo economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte empregado, entre eles destacam-se os suportes como dextrana, quitina e quitosana, fosfato de zircônio, óxido de nióbio, alumina, carvão ativado, matrizes poliméricas como amberlite, poli-óxido etileno (PEO), poli (ácido carboxílico) poliacrilonitrila, resinas constituídas de estireno, divinilbenzeno e materiais silícios (KENNEDY, 1987; ZANIN, 1989; GONÇALVES, 1996; VILLENEUVE *et al.*, 2000; DASH *et al.*, 2011; MACHADO, 2011).

A seleção do suporte depende da natureza própria da enzima e de algumas características do material do suporte, tais como: área superficial, composição química, estabilidade térmica, insolubilidade, resistência mecânica, porosidade, além de impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação (MATEO *et al.*, 2007).

2.4.1 Poliuretanos (PU)

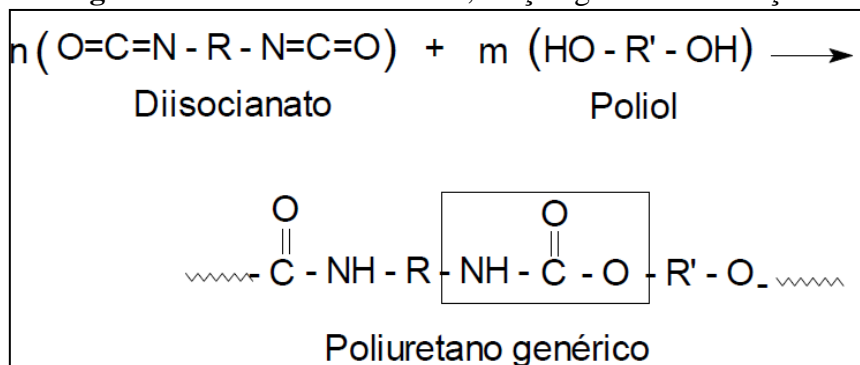
A criação dos poliuretanos é atribuída ao químico industrial alemão Otto Bayer (1902–1982), que descobriu a reação de poliadição de isocianatos e polióis. O produto foi inicialmente desenvolvido como um substituto da borracha, no início da Segunda Guerra Mundial (www.americanindustry.com).

Um poliuretano (PU) pode ser definido como um polímero resultante da reação de um isocianato e um composto hidroxilado, em que ambos podem ser di ou polifuncionais (DELPECH, 1999; YEGANEH, 2005; KLOSS, 2007; LINGAPPA, 2011).

Os isocianatos podem ser aromáticos, alifáticos, ciclo-alifáticos ou policíclicos. Podem ser representados pela fórmula geral $R(-N=C=O)_n$, onde o radical aromático R é o principal e n é a funcionalidade, que normalmente é igual a dois (diisocianato) ou superior (poliisocianato) (KLOSS, 2007). Já os polióis, com compostos de hidroxilas terminais na molécula, podendo ser entre 2 (diois) e 3 (triois). Podem ainda ser poliéteres ou possuir estrutura hidrocarbônica (AGNELLI, 1983; WOODS, 1995; ZAWADZKI, 1996; VILMAR, 2013).

A natureza química, bem como a funcionalidade dos reagentes deve ser selecionada de acordo com as propriedades finais desejadas. Esta flexibilidade permite obter uma infinita variedade de compostos com diferentes propriedades físicas, químicas e morfológicas, de acordo com necessidades específicas de uma determinada aplicação, fazendo com que os PU ocupem posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de alto desempenho (WOOLEY, 1994; STEVENS, 1999; CANEVAROLO *et al.*, 2002; PRABAHARAN, 2006; AKCELHUD, 2007; CANAUD, 2007; KLOSS, 2007; SANTOS, 2011; ALBIQUIM, 2013).

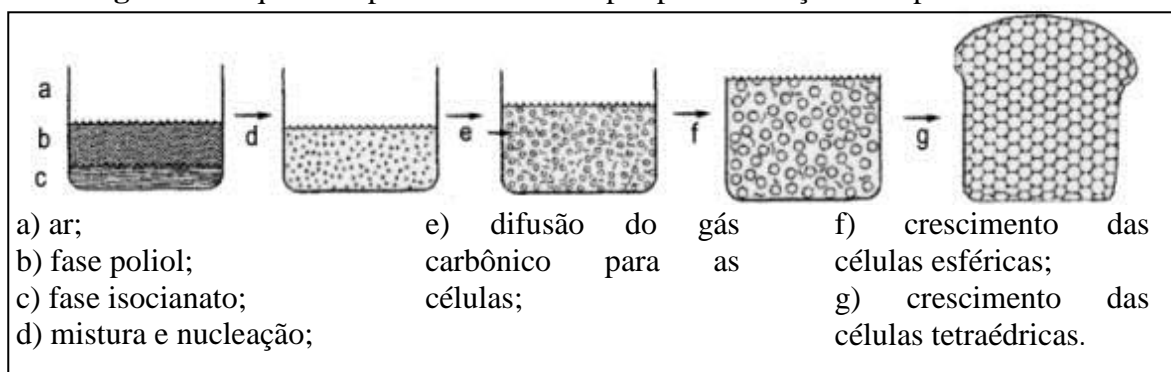
Os poliuretanos (PUs) são obtidos a partir de uma reação química quase instantânea de poliadição de um poliisocianato (di ou polifuncional) com um polioliol (Figura 5), podendo ainda ocorrer a adição de outros reagentes (com dois ou mais grupos de hidrogênio reativos) como: agentes de cura ou extensores de cadeia, contendo dois ou mais grupos reativos; catalisadores; agentes de expansão; surfactantes; cargas; agente antienvelhecimento; corantes e pigmentos; retardantes de chama; desmoldantes; etc. (MANO 1999, CALLISTER 2000, CANAUD 2007, VIEIRA 2009, VILMAR 2013).

Figura 5. Poliuretano Genérico, reação geral de obtenção.

FONTE: KLOSS, 2007.

Polimerização

A formação da espuma de PU ocorre em duas fases, à primeira fase é de dispersão dos reagentes onde o primeiro passo no processo de espumação consiste em compatibilizar vários ingredientes, alguns dos quais imiscíveis. Em seguida ocorre a segunda fase, a de nucleação, onde as bolhas de ar são introduzidas durante a etapa de mistura dos reagentes (CANAUD, 2007; VILMAR, 2013). A Figura 6 apresenta o esquema representativo das etapas para formação da espuma.

Figura 6. Esquema representativo das etapas para formação da espuma de PU.

FONTE: VILMAR, 2013.

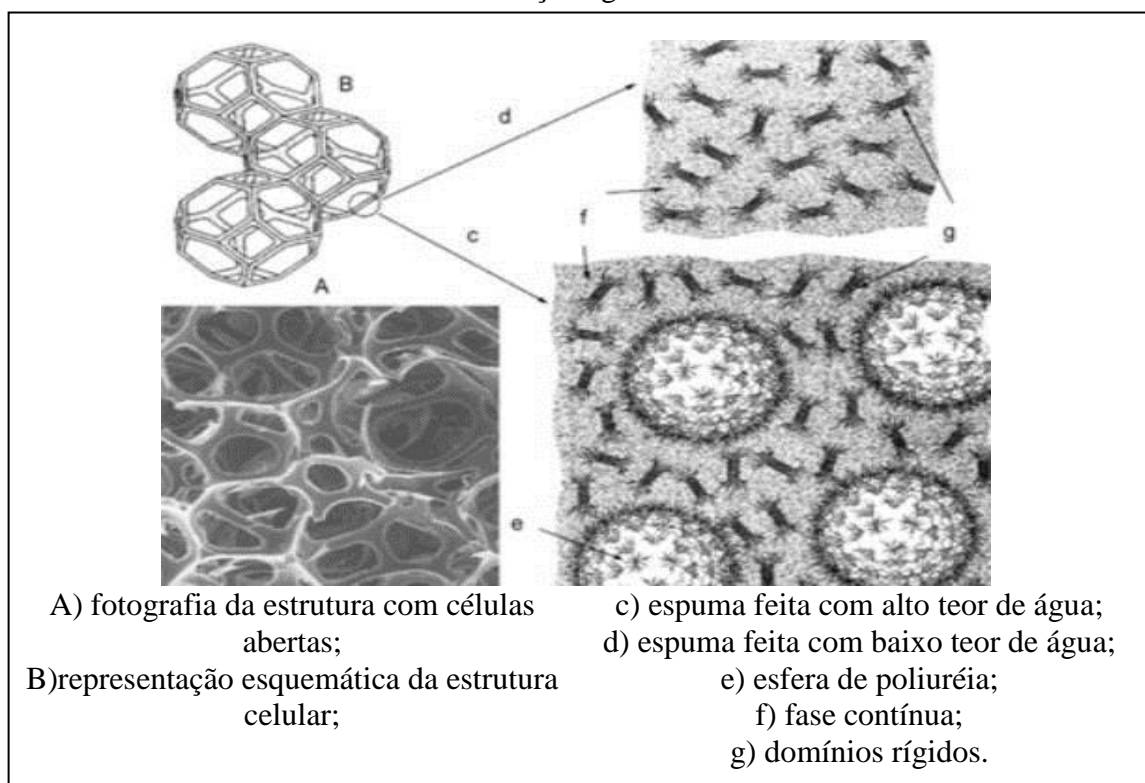
Na ausência de qualquer surfactante o volume de ar introduzido é muito pequeno. As bolhas são poucas e grandes e ocorre coalescência sem a influência estabilizante do surfactante. A tensão superficial do surfactante aumenta o volume de núcleos de ar misturado aos reagentes e diminui a tendência do gás difundir das bolhas menores para as maiores. Isto resulta em espuma com células maiores e mais uniformes

(ZAREVÚCKA, 1996). Após, com o crescimento das bolhas, vários mecanismos conduzem ao crescimento de célula (VILMAR, 2013):

- difusão do gás recém-formado para as bolhas existentes;
- reação entre água e isocianato produz gás carbônico;
- simultaneamente, o calor de reação vaporiza o agente de expansão auxiliar. A solução se torna supersaturada com gás, o gás dissolvido começa a sair da solução;
- expansão do gás nas bolhas devido a calor de reação;
- difusão do gás de bolhas menores para as bolhas maiores.

Na Figura 6 pode ser visualizado o esquema que representa a nucleação e o crescimento da espuma de PU (VILMAR, 2013). A Figura 7 apresenta a estrutura celular da PU, sem e com adição de água para a formação da espuma.

Figura 7. Morfologia das espumas flexíveis convencionais de PU preparadas com adição água.



FONTE: VILMAR, 2013.

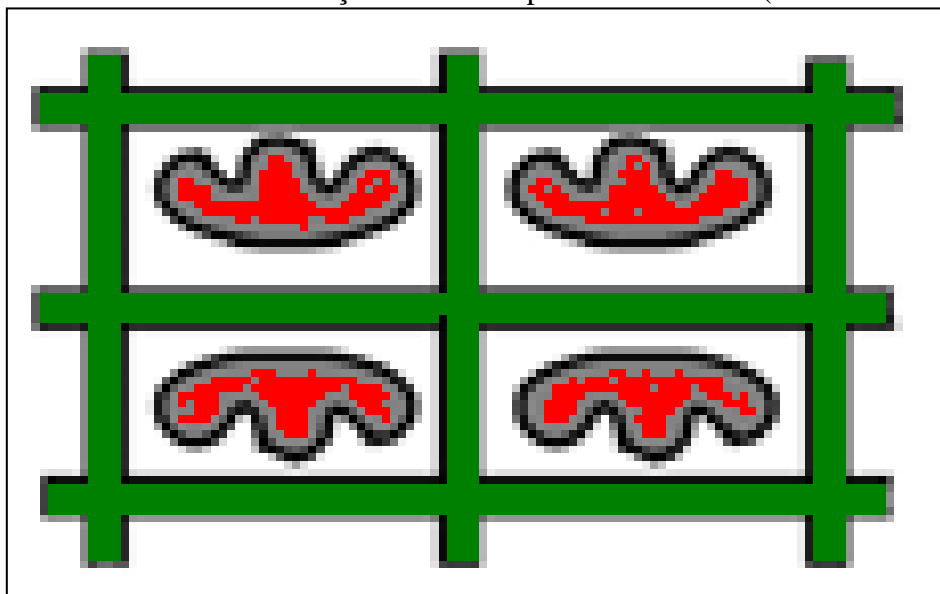
A estabilização ocorre com a coalescência das células, que ocorre quando a camada líquida que separa das bolhas, ocorrendo rompimento, devido à instabilidade. Depois de formadas as células na espuma em crescimento devem ser estabilizadas até que as estruturas atinjam resistência suficiente através da polimerização.

2.4.1.1 Aplicação de Poliuretano como Suporte para Imobilização

O Poliuretano (PU) é um polímero que compreende uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações uretânicas. São amplamente usados em espumas rígidas, flexíveis, elastômeros duráveis, adesivos de alto desempenho, selantes, fibras, vedações, gaxetas, preservativos, carpetes, peças de plástico rígido e tintas (CATAL, 2010; VILMAR, 2013).

O sucesso de biomateriais a partir de polímeros é a relativa facilidade/baixo custo em que eles podem ser sintetizados com ampla faixa de propriedades como: alta resistência mecânica, baixo atrito, dureza, elasticidade. A grande variedade de reações envolvidas na ciência dos polímeros torna altamente desejável descobrir e desenvolver novas estratégias de síntese e gerar novos biomateriais poliméricos a partir dessas estratégias, buscando assim novas formas de aplicações destas estruturas (VILMAR, 2013). A Figura 8 apresenta um sistema de imobilização genérico de enzima, retida nos poros do suporte de PU (CARDOSO, 2009).

Figura 8. Sistema de imobilização de enzima por confinamento (inclusão na matriz).



FONTE: CARDOSO 2009.

Os poliuretanos também têm sido investigados para utilização como suportes enzimáticos, principalmente em reações em meio orgânico, onde a enzima fica retida na estrutura porosa da matriz (KENNEDY *et al.* 1987).

O uso de catalisador enzimático em fluido supercrítico empregam meios orgânicos, na tentativa de avaliar seus efeitos na polimerização, buscando o desenvolvimento de um novo processo tecnológico com viabilidade técnica e econômica (SANTOS, 2011).

A aplicação de poliuretano foi também investigada para utilização em imobilização de *P. chrysosporium* em biorreatores para oxidação de hidrocarbonetos poliaromáticos, em processos de descoloração de corantes, como o poly r-478 e na degradação de organoclorados (COUTO *et al.*, 2000; SHIM *et al.*, 2002). A capacidade de remoção de sulfatos de águas residuais por meio de bactérias sulfato-redutoras imobilizadas em espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno de baixa densidade e cerâmicas baseadas em alumínio, foram avaliadas. Os resultados indicaram o favorecimento das condições anaeróbias necessárias ao desenvolvimento desses microrganismos, bem como o aumento da resistência desses resíduos contendo altas concentrações de sulfato (SILVA *et al.*, 2006).

A caracterização das células de micro-organismos em partículas de espuma de poliuretano está diretamente relacionada a de retenção da biomassa dentro da matriz: sendo aderida ao suporte, micro grânulos e mecanicamente retidos nos poros da espuma, bem como células dispersas aderidas a partículas, permitindo a otimização dos fluxos de substratos e produtos entre as espécies imobilizadas na matriz (AZEVEDO, 2005).

2.5 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Em reações enzimáticas, o uso de lipases puras (sistema homogêneo) pode tornar o processo muito dispendioso e, seu descarte após o uso, economicamente inviável (SILVA *et al.*, 2009a). O aumento do número de possibilidades de aplicações de lipases em reações de sínteses e biotransformações demandam um biocatalisador imobilizado eficiente, possibilitando seu reuso, como também, melhora na estabilidade e a atividade da enzima (BALCÃO, 1996; ANDERSON, 1998; SHARMA *et al.*, 2001).

O uso de suportes hidrofóbicos (finil-agarose e octilagarose) e quitosana para a imobilização de lipases de *Acremonium sp.*, para a produção de biodiesel tem se mostrado vantajoso (BOSCOLO, 2012). Em outro estudo utilizando também suporte hidrofílico Accurel EP 100 (polipropileno) foram investigados na imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a obtenção de compostos quirais (BARON, 2008).

Os poliuretanos vêm sendo investigados como suportes enzimáticos de reações em meio orgânico, devido a sua resistência a solventes orgânicos (KENNEDY *et al.*, 1987). A aplicação de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano na glicerólise do óleo de bagaço de azeitona, refinado em *n*hexano, para a produção de glicerídeos parciais: monoacilglicerois (MAG) e diacilglicerois (DAG). (CORREIA, 2011). Na Tabela 6 estão apresentados alguns suportes empregados para a lipase CAL B, bem como suas aplicações na indústria.

Tabela 6. Diferentes suportes e aplicações da lipase CAL B.

| Suporte Tipo de Imobilização | Finalidade | Referencia |
|--|--|--------------------------------------|
| carvão ativado granular/ tecido de carbono | síntese de biodiesel | NARANJO <i>et al.</i> , 2010. |
| hidrogel-glutaraldeido epicloridrina | hidrolise de ésteres | RODRIGUES <i>et al.</i> , 2008. |
| resina acrílica/solvente | síntese de biodiesel - óleo de palma e etanol | INOUE <i>et al.</i> , 2011. |
| celite/solução – gel | biodiesel | MEUNIER <i>et al.</i> , 2010. |
| sílica a erogel | biodiesel | NASSREDDINE <i>et al.</i> , 2008. |
| poli (propileno) | esterificação do acido oleico com octanol | BOSLEY <i>et al.</i> , 1997. |
| tecido de carbono/pré- tratamento com etanol | biodiesel | NARANJO <i>et al.</i> , 2010. |
| k-carrageenan | biodiesel | JAGANNATHAN <i>et al.</i> , 2010. |
| quitosana-alginato e em agarose/glutaraldeido | synthese de ésteres de vitamina A | SILVA, 2007. |
| quitosana/glutaraldeido | biodiesel - do óleo de mamona | JÚNIOR, 2008. |
| fibra de coco verde | butirato de metila | PINHEIRO <i>et al.</i> , 2011. |
| nylon – 6/glutaraldeido | biodiesel - do óleo da mamona | PAHUJANI <i>et al.</i> , 2007. |
| películas de quitosano/gelatina-hidrogel | esterificação acido oleico e butanol | RAMGEL <i>et al.</i> , 2011. |
| carvão ativado/butirato de metila | biodiesel | CAVALCANTE, 2011. |

A lipase *Aspergillus niger* imobilizada em espuma de poliuretano também foi avaliada em reações de biotransformação em monômeros/aligômeto cíclico, na presença de solvente orgânico. (KLOSS, 2007; LINGAPPA, 2011; SILVA *et al.*, 2012b). A lipase *Cândida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano hidrófilas

("HYPOL'FHP2002" e "HYPOL'FHP5000") também foi avaliada para a síntese de butirato de etila, um éster de sabor frutado, em n-hexano (PIRES – CABRAL *et al.*, 2007). Considerando a lipase CAL B são relatados diferentes tipos de imobilização, suportes e aplicações desta enzima imobilizada.

Cabe ressaltar ainda, dentre as aplicações industriais importantes de CAL B, tanto na forma livre quanto imobilizada, a síntese de triglicerídeos e esterificação de álcoois terpênicos; esterificação de açúcares, nucleosídeos e esteróides; resolução de álcoois secundários via hidrólise ou esterificação em solventes orgânicos; síntese de anti-inflamatórios, bem como na síntese de ésteres constituintes de flavorizantes e fragrâncias (LARIOS *et al.*, 2004), na acilação de flavonóides (PASSICOS *et al.*, 2004).

Como suporte alternativo destaca-se a fibra da casca de coco verde, a qual foi investigada, na imobilização da lipase CAL B, aplicada na reação de transesterificação de óleo de macaúba (BRÍGIDA, 2006).

2.6 ESTABILIDADE DAS LIPASES

O custo da imobilização deve ser compensado pelo acréscimo da viabilidade catalítica da enzima e da manutenção das propriedades físicas do suporte (resistência mecânica e ao ataque por reagentes químicos) (CASTRO, 2008). De acordo com a literatura as propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas podem variar significativamente em função da sua origem, isoformas e das condições de reação, como tempo de incubação, pH e temperatura, além, do substrato utilizado (PASTORE, 2010; ORLANDELLI, 2012; CABRAL *et al.*, 2013).

Segundo a literatura, as enzimas na sua forma solúvel são moléculas de certa flexibilidade, muito delicada e frágil. Para que uma enzima tenha potencial para aplicação industrial um requisito importante é a estabilidade, buscando reduzir a quantidade do biocatalizador requerido. A estabilidade em solventes orgânicos, principalmente para reações de síntese, e o aumento do potencial de reutilização das moléculas protéicas são primordiais neste contexto (MARTINI, 2007; JÚNIOR, 2008; INOUE, 2011).

A lipase CAL B imobilizada em quitosana-alginato ativado com glutaraldeído (2%) apresentou uma melhora na estabilidade térmica a 60°C, sendo aproximadamente 29 vezes mais estável que a enzima livre. Além disso, apresentou-se duas vezes mais estável do que a enzima comercial Novozyme 435 (SILVA, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos laboratoriais realizados no laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regionais Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI - Erechim, durante a fase experimental realizada no âmbito deste trabalho relacionado ao estudo da imobilização em suporte de poliuretano (PU) da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) e as metodologias empregadas em avaliações preliminares da aplicação da lipase imobilizada na catálise de reações de síntese também serão apresentadas nesta seção do trabalho.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

- Acetona (CH_3COCH_3), PM ($58,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) FMaia;
- Ácido Oléico ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$) PM ($282,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Vetec;
- Ácido Propiônico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$) PM ($74,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Merck;
- Álcool Etílico (Etanol 95 %) ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) PM ($46,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Merck;
- Geraniol ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$) PM ($154,24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Vetec;
- Hidróxido de Sódio (NaOH) PM ($40,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Nuclear;
- Isocianato (Empresa Flexível Poliuretanos);
- Polioliol (Empresa Flexível Poliuretanos).

3.1.1.1 Enzima

A enzima utilizada foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ) de alta qualidade, adquirida na forma liofilizada da empresa Novozymes Latin América LTDA, selecionada a fim de avaliar o potencial do PU como suporte para imobilização de lipases para uso em reações de síntese. A Figura 9 apresenta a lipase CAL B usada neste trabalho.

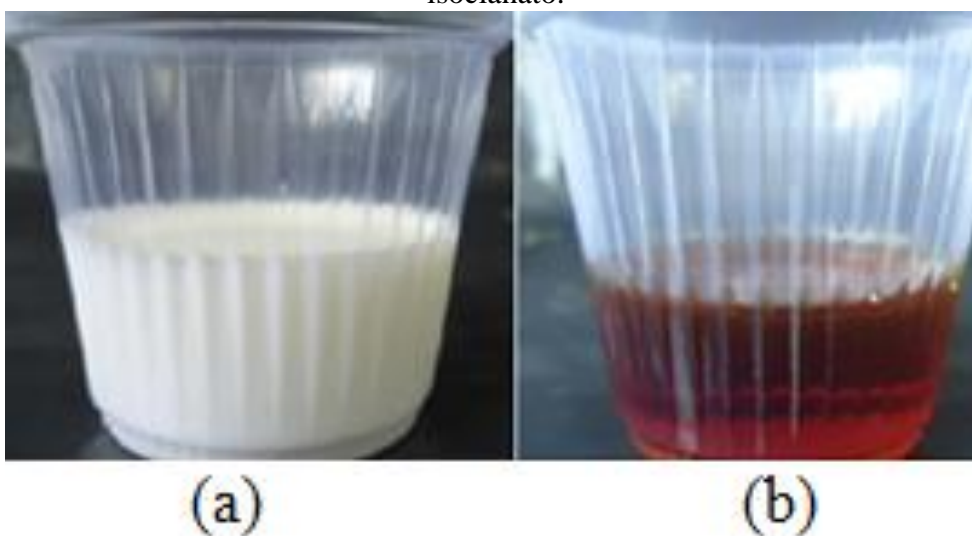
Figura 9. Lipase comercial de *Candida antarctica* CAL B, Novozymes.



3.1.1.2 Suporte

Os monômeros comerciais Polioliol e Isocianato, utilizados nesse trabalho foram produzidos para uma formulação específica para colchões e espumas injetadas para a Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes. A Figura 10 apresenta os monômeros utilizados para elaboração da espuma de PU usado como suporte no processo de imobilização da lipase CAL B.

Figura 10. Monômeros usados na elaboração da espuma de PU, (a) póliol e (b) isocianato.



3.1.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Agitador magnético com potencia 650w (Fisatom);
- Agitador orbital (Marconi MA-410);
- Balança analítica (Shimadzu);
- Bomba a vácuo TE-0,58 (Tecnal);
- Difrátômetro de raio-X (Rigaku), Miniflex II, com tubo emissor de Cu-1,54;
- Estufa(Fanem, modelo 320SE);
- pH metro MA- 522 (Marconi);
- Micropipeta (Transferpette);
- Geladeira (Consul).
- Papel Filtros (Nalgon)

3.2 MÉTODOS

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram desenvolvidos em etapas, conforme descrito abaixo:

- ✓ Avaliação da polimerização utilizando diferentes volumes dos monômeros;
- ✓ Verificação da miscibilidade da enzima nos monômeros;
- ✓ Avaliação do efeito da forma física e concentração da lipase CAL B na formação do polímero;
- ✓ Avaliação da distribuição da lipase CAL B no volume total do suporte de PU;
- ✓ Estudo da Imobilização;
- ✓ Avaliação da capacidade de reciclos reacionais da lipase CAL B imobilizada;
- ✓ Avaliação da aplicação da lipase CAL B em reações de síntese;
- ✓ Caracterização estrutural do polímero e enzima imobilizada

A seguir será apresentada uma descrição detalhada dos procedimentos experimentais elencados anteriormente.

3.2.1 Polimerização dos Monômeros

O procedimento de polimerização realizado para obtenção do suporte avaliado

na pesquisa foi adaptado da metodologia descritas por SILVA *et al.*, 2012a. Para a elaboração do PU, foi avaliado o uso de diferentes concentrações dos monômeros (poliol e isocianato), como apresentado na Tabela 5. Foram realizados 8 ensaios com diferentes combinações das proporções dos monômeros.

Tabela 7. Descrição das concentrações dos monômeros avaliadas para formação da espuma de PU.

| Ensaio | Proporções (v/v) | |
|--------|------------------|----------------|
| | Poliol (%) | Isocianato (%) |
| 1 | 95 | 0,5 |
| 2 | 90 | 10 |
| 3 | 75 | 25 |
| 4 | 65 | 35 |
| 5 | 60 | 40 |
| 6 | 50 | 50 |
| 7 | 25 | 75 |
| 8 | 10 | 90 |

Com o auxílio de duas seringas descartáveis e um recipiente de poliestireno (200 mL) os monômeros foram misturados e homogeneizados, com o auxílio de um bastão de vidro, por aproximadamente 15 segundos, em banho de gelo, para evitar um aumento excessivo da temperatura, ou seja, superiores a 70 °C, devido à reação de polimerização ser exotérmica.

Após 5 minutos ocorreu a expansão da espuma e completa solidificação da mesma, possibilitando visualizar algumas características da espuma formada, como conformação, flexibilidade, maciez, firmeza, porosidade interna e resistência (ZAIAT 1996, LUCAS *et al.* 2001; SANTOS 2011). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.2 Avaliação da Miscibilidade da Enzima nos Monômeros

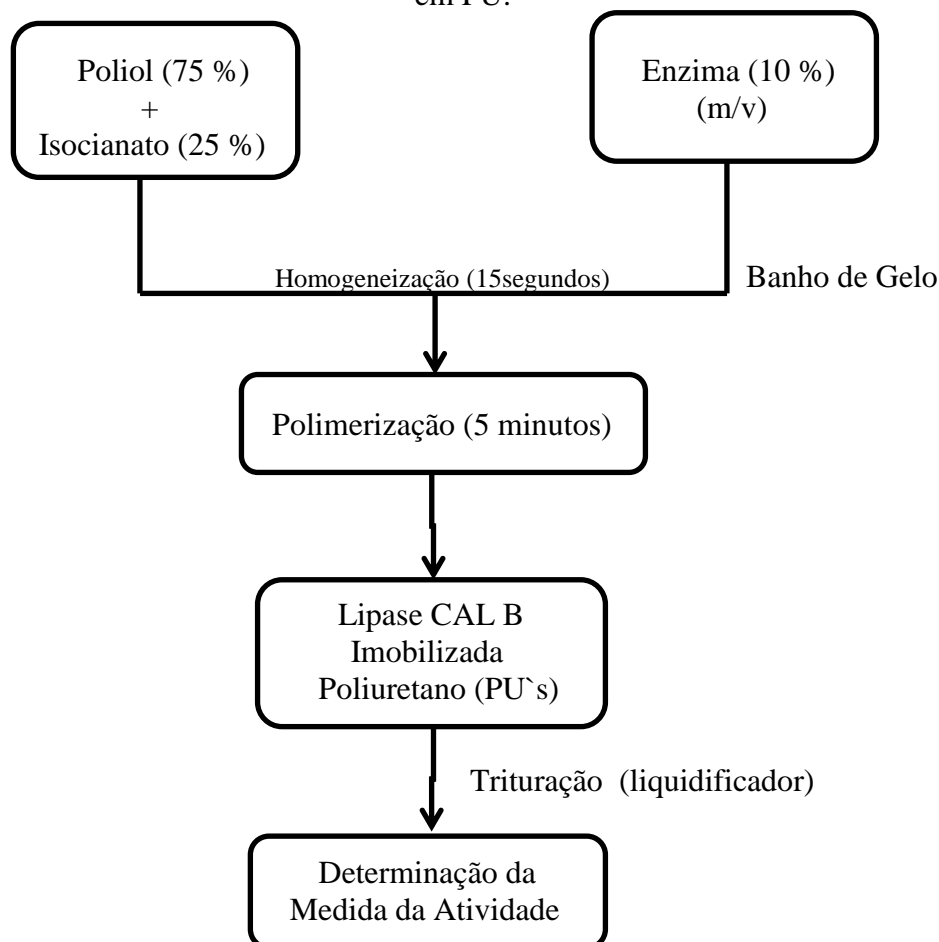
Previamente a etapa de imobilização foram conduzidos ensaios de solubilidade da enzima lipase CAL B liofilizada nos monômeros poliol e isocianato, bem como em diferentes solventes (etanol, água e acetona), visando seu emprego na forma de uma solução. Nesta etapa avaliaram-se diferentes relações massa de enzima:volume de monômero/solvente.

3.2.3 Imobilização

O procedimento experimental para imobilização da CAL B em PU foi realizada utilizando a proporção dos monômeros selecionada na etapa 3.2.2.1 (Tabela 5, ensaio 3), empregando a enzima no estado sólido, pó liofilizado (0,8g) e em solução (0,8 mL) enzimática preparada (0,8g em 5 mL de solvente) com diferentes solventes: etanol (EE), acetona (EA) e água (EH).

O imobilizado foi produzido pela mistura da enzima liofilizada ou em solução (correspondendo a 10 % do volume total dos monômeros) em polioliol e estes adicionados ao isocianato, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 11.

Figura 11. Apresentação esquemática do procedimento de imobilização da lipase CAL B em PU.

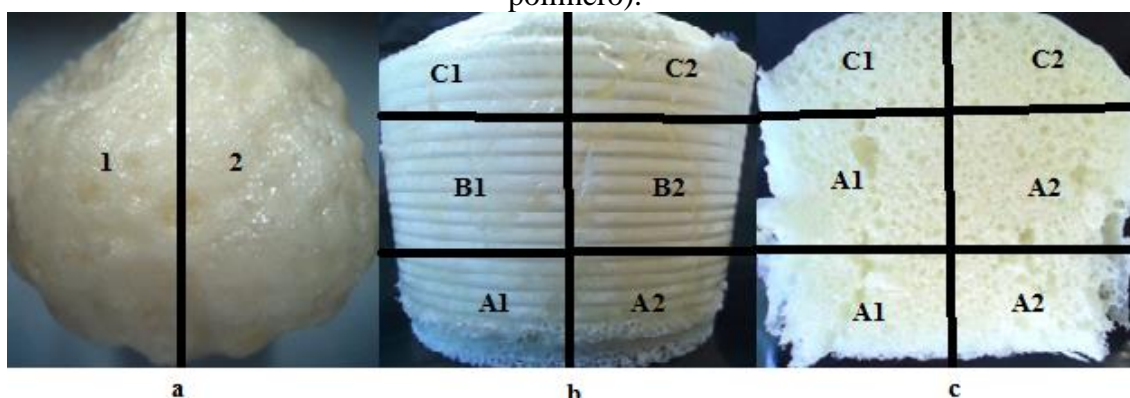


Cabe ressaltar que o método de imobilização utilizado nesta pesquisa consiste no método de encapsulamento, onde ocorre a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, realizando o

“confinamento” da proteína no polímero insolúvel, resultando no biocatalisador imobilizado (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; GONÇALVES, 2007).

Para avaliar a homogeneidade da distribuição da enzima no suporte, após a polimerização, a estrutura formada com a enzima incluída foi dividida verticalmente em duas parcelas (1 e 2) e horizontalmente em três (A, B e C), (Figuras 12^a, 12b e 12c). Para realização da dosagem da atividade de cada fração, as mesmas foram trituradas em liquidificador (modo pulsar) até completa trituração. Posteriormente a pesagem, as diferentes frações foram identificadas, pesadas e submetidas à verificação da atividade enzimática de esterificação, segundo método descrito no (item 3.2.4). Este procedimento foi realizado em triplicata para os dois ensaios de imobilização, verificando assim a reprodutibilidade dos resultados em relação a distribuição da lipase CAL B no polímero formado.

Figura 12. Demonstração da metodologia de amostragem da espuma de PU formada com Lipase CAL B, considerando em (a) divisão em duas parcelas (1 e 2) na vertical (vista superior do polímero), (b) visão externa da divisão em três parcelas (A, B e C) do polímero (c) divisão em três parcelas (A, B e C) na horizontal (vista lateral do polímero).



Após a medida de atividade em cada fração, as mesmas foram misturadas em uma porção homogênea, a qual teve sua atividade mensurada, sendo esta considerada a atividade total do imobilizado (100 %) e relacionando cada parcela em porcentagem de cada fração.

3.2.4. Dosagem da Atividade de Esterificação

A atividade de esterificação foi quantificada através de uma reação de síntese, empregando o ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) como reagentes, metodologia esta modificada das descritas por BERNARDES *et al.* (2007) e LANGONE *et al.* (2002). Após a realização do ensaio em branco, para determinar a acidez do meio reacional, foi

conduzida a adição da enzima CAL B, livre (0,1 g da solução enzimática) e imobilizada em PU (0,1g contendo 0,16% de enzima). A reação foi conduzida a 40 °C, durante 40 minutos, em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Para as medidas de acidez (conduzidas volumetricamente, empregando o NaOH 0,05 M como titulante), alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionado a cada alíquota 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v).

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de Sódio (NaOH) 0,05 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V_f = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

M_{EL} = peso da enzima livre (solução enzimática)/imobilizada;

V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

3.2.5 Cálculo do Rendimento de Imobilização

O rendimento do imobilizado foi calculado considerando a atividade total da enzima livre em solução (a qual considera o volume de extrato enzimático empregado no ensaio de imobilização) e a atividade total do imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido) de acordo com a equação 2 (BRÍGIDA, 2006).

$$RI (\%) = \frac{U_{\text{imobilizada}}}{U_o} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

$RI (\%)$ = Rendimento de imobilização

$U_{\text{imobilizada}}$ = atividade enzimática no imobilizado

U_0 = atividade da solução enzimática oferecida para imobilização

3.2.6 Avaliação da Estabilidade da Enzima Livre e Enzima Imobilizada

O estudo de estabilidade térmica da CAL B livre foi conduzido em frascos emendorff, com a solução enzimática na concentração equivalente a usada no processo de imobilização (0,16%). A dosagem da atividade foi determinada pelo método da esterificação descrito no item 3.2.4. As temperaturas foram selecionadas de acordo com a temperatura ótima da enzima lipase CAL B, sendo elas descritas a seguir:

- Temperatura de 40 °C (EL_40 °C);
- Temperatura de 60 °C (EL_60 °C);
- Temperatura de 80 °C (EL_80 °C).

Para a enzima imobilizada em PU, armazenadas em frasco de polipropileno com tampa, foram avaliadas duas formas de acondicionamento: (1) lipase CAL B imobilizada estocada a seco e (2) lipase CAL B imobilizada estocada no meio reacional (ácido oléico e etanol). As temperaturas avaliadas para as difreentes formas de armazenamento encontram-se descritas a seguir:

1- Imobilizado no suporte de PU acondicionado à seco:

- Temperatura ambiente (ASA);
- Temperatura de geladeira (ASG 2-8 °C);
- Temperatura de 40 °C (AS_40 °C);
- Temperatura de 60 °C (AS_60 °C);
- Temperatura de 80 °C (AS_80 °C);

2- Imobilizado no suporte de PU acondicionado com o meio reacional:

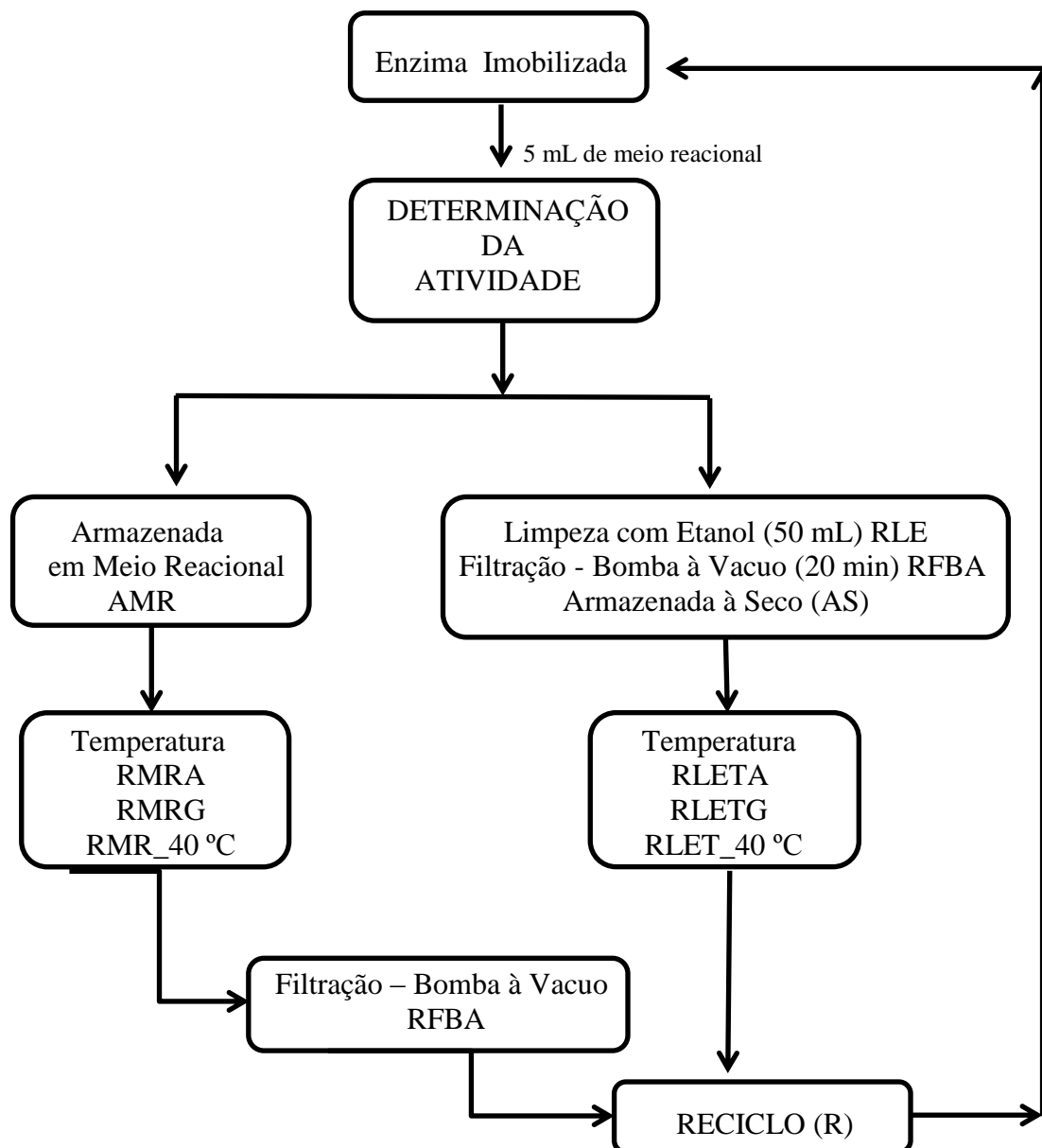
- Temperatura de 40 °C (AMR_40 °C);
- Temperatura de 60 °C (AMR_60 °C);
- Temperatura de 80 °C (AMR_80 °C).

3.2.7 Avaliação da Capacidade de Reciclos Reacionais da Lipase CAL B Imobilizada

O principal interesse em imobilizar enzimas é propiciar a reutilização da mesma. Desta forma, avaliou-se a capacidade de reciclos reacionais de síntese do oleato de etila (ácido oléico e etanol) da lipase CAL B imobilizada em PU, buscando simular a

reutilização do biocatalisador em reações de interesse. Os ciclos foram avaliados em períodos de 24 horas. Após a reação o imobilizado foi submetido a diferentes condições de estocagem antes de sua reutilização, cujos procedimentos encontram-se descritos na Figura 13.

Figura 13. Metodologia de preparo e acondicionamento da lipase CAL B imobilizada durante o processo da avaliação de ciclos reacionais



Buscando identificar possíveis alterações conformacionais do imobilizado e ou estabilidade da enzima em detrimento do método de conservação ao qual o biocatalisador foi submetido entre um ciclo e outro, amostras da enzima imobilizada foram submetidas a duas condições de estocagem a primeira no meio reacional e na

segunda passando por processo de limpeza (etanol 95 %) após a reação, bem como de preparo do biocatalizador para uma nova batelada de reação.

Foram também avaliadas diferentes condições (ambiente, geladeira e 40 °C) de armazenamento durante os intervalos de 24 horas dos ciclos, sendo a metodologia e nomenclatura de cada processo descrito a seguir:

1 Imobilizado utilizado acondicionado ao meio reacional não submetido a procedimento de lavagem:

- Temperatura ambiente (RMRA);
- Temperatura de geladeira (RMRG 2-8 °C);
- Temperatura de 40 °C (RMR_40 °C);

2 Imobilizado utilizado, lavado com etanol (50 mL) com auxílio de bomba a vácuo, sob filtro, durante 20 min e posteriormente acondicionado à seco:

- Temperatura ambiente (RLETA);
- Temperatura de geladeira (RLETG 2-8 °C);
- Temperatura de 40 °C (RLET_40 °C);

Cabe ressaltar o imobilizado, após reação de dosagem da atividade (item 3.2.4), foi submetido à lavagem com etanol (95 %) em filtro conectado a bomba à vácuo, mantido sobre o filtro até secagem aparente.

No caso de acondicionamento no meio reacional, após a reação o imobilizado em meio reacional foi transferidos para frasco de armazenamento, este antes de ser submetido a uma nova avaliação de dosagem da atividade sendo apenas filtrado, sem lavagem e mantido sobre o filtro até secagem aparente.

3.2.8 Avaliação da Aplicação da Lipase CAL B Imobilizada na Catálise de Reações de Síntese

Nesta etapa serão apresentadas as metodologias empregadas na avaliação da aplicação das lipase CAL B imobilizada em PU na catálise de reação de síntese de geranyl oleato, geranyl propionato e o oleato de etila. A metodologia empregada foi adaptada de FERRAZ (2012).

3.2.8.1 Síntese Enzimática de Geraniol e Ácido Oleico

A síntese enzimática para a produção de geranyl oleato foi realizada conforme metodologia descrita por PAROUL (2011), onde foram usados como substratos geraniol (99 % de pureza) e ácido oleico (99 % de pureza) na proporção molar de 3:1. Esses substratos foram adicionados em erlemeyers de 50 mL com volume médio racional de 5 mL (PAROUL, 2011).

A avaliação da capacidade de reação da CAL B imobilizada em reação de síntese de geranyl oleato foi realizada à 40 °C durante 6 horas em agitador orbital a 160 rpm. Após este período foram retiradas alíquotas de 500 µL do meio reacional em triplicata e adicionadas à 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v).

A quantificação da síntese de geranyl oleato foi realizada por titulação em NaOH 0,05 M, até pH 11. A determinação do rendimento da síntese do geranyl oleato foi determinada segundo item 3.2.9.4.

3.2.8.2 Esterificação Enzimática de Geraniol e Ácido Propiônico

A avaliação da capacidade de reação da CAL B imobilizada em reação de esterificação de geraniol propionato foi conduzida empregando as mesmas condições experimentais descritas para a síntese do geranyl oleato, empregando como reagentes o geraniol (99 % de pureza) e o ácido propiônico (99 % de pureza) na proporção de (3:3).

A quantificação da síntese de geraniol propionato foi realizada por titulação em NaOH 0,05M, até pH 9,1. A determinação do rendimento da síntese do geranyl oleato foi determinada segundo item 3.2.9.4.

3.2.8.3 Esterificação Enzimática de Ácido Oleico e Etanol

A avaliação da capacidade de reação da CAL B imobilizada em reação de síntese do oleato de etila foi realizada através da reação do ácido oleico e etanol (razão molar (1:1)). A reação foi conduzida a 40 °C, durante 40 minutos, em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionado cada alíquota 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v). A determinação do rendimento da síntese do etil oleato foi determinada segundo item 3.2.9.4.

3.2.8.4 Determinação do Rendimento das Reações de Síntese

A determinação do Rendimento das Reações de Síntese foi realizado utilizando metodologia descrita por PAROUL (2011), empregando a equação 4.

$$CE = 100 - \left(\frac{\left(\frac{M \times V_a}{V_c} \right) \times V_f}{MR} \right) \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

CE = cálculo de conversão em ésteres (%)

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40min (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V_f = volume final de meio reacional (mL);

MR = mols que reagiu (inicial 100 %)

V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

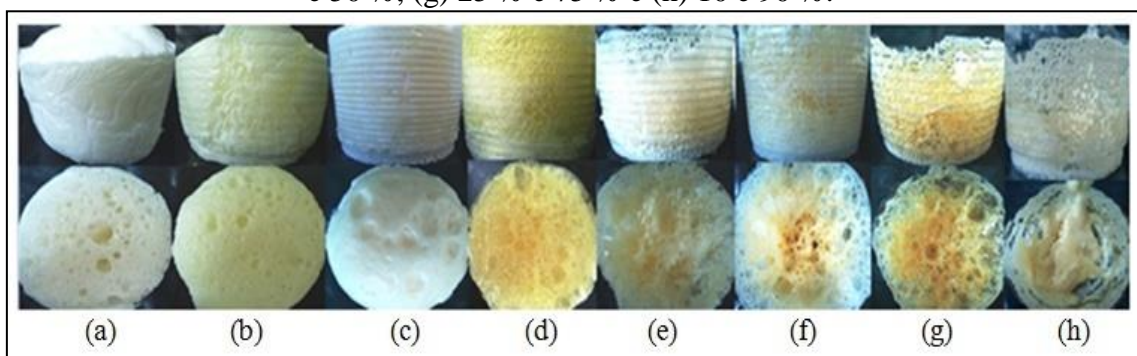
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa. Inicialmente, apresenta-se a avaliação da conformação da espuma de poliuretano a ser usada como suporte para imobilização da lipase CAL B, a influência da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada e a capacidade de ciclos reacionais para então definir possibilidades de aplicação em reações de síntese do geranil propionato, geranil oleato e o oleato de etila.

4.1 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO: SÍNTESE DO POLIURETANO (PU)

Para a síntese do PU foram avaliadas diferentes proporções dos monômeros polioliol e isocianato. Como parâmetro de avaliação acompanhou-se visualmente a consistência, a estabilidade quanto ao efeito de retração do volume, defeitos de conformação, a maleabilidade e a conformação dos poros da espuma (ZAIAT, 1996). A Figura 14 apresenta o aspecto conformacional das espumas de PU sintetizadas empregando as diferentes proporções de polioliol e isocianato.

Figura 14. Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros polioliol e isocianato, respectivamente, sendo (a) 95 % e 5 %, (b) 90 % e 10 %, (c) 75 % e 25 %, (d) 65 % e 35 %, (e) 60 % e 40 %, (f) 50 % e 50 %, (g) 25 % e 75 % e (h) 10 e 90 %.



Os resultados apresentam uma tendência em relação à proporção dos monômeros, quanto maior a concentração de polioliol menor é o efeito de retração da estrutura do PU, formado uma estrutura maleável/macia com as células compactas. O aumento da proporção de isocianato conduz a geração de uma estrutura mais rígida, com porosidade disforme e um volume aparente reduzido. Para a condição de 10 % de polioliol e 90 % de isocianato (Figura 14h), praticamente não houve formação de espuma,

somente a formação de um gel no centro da estrutura envolta por uma fina camada de espuma expandida.

O acréscimo da dureza da estrutura está relacionado ao aumento das forças intermoleculares. Em geral, poliuretanos com alto teor de isocianato tornam-se mais rígidos, devido ao aumento das ligações cruzadas, proporcionando uma maior aderência e compactação dos poros (BOLSONI, 2008; PAULICHEI, 2010).

As particularidades observadas nas espumas de PU formadas decorrem das proporções dos monômeros empregados para a síntese do PU. A escolha dos monômeros (diisocianatos e polióis) empregados na formação da espuma, cada um com suas características próprias e funcionalidades, também podem interferir na qualidade destas espumas (PINTO *et al.*, 2005, MENG, 2008).

A estrutura química do PU, que é bastante complexa e dependente do diisocianato constituinte, podendo ser diol ou poliálcool, resultando em poliuretanos completamente diferentes. O isocianato pode reagir com diferentes grupos químicos e as propriedades finais do polímero irão variar de acordo com o percurso da reação. Poliuretanos podem ter estruturas muito diferentes, dependendo do tipo de isocianato e o dos componentes de hidrogênio reativos presentes na formulação (CATAL, 2010; SANTOS, 2011).

Dependendo da aplicação, características como densidade, rigidez e porosidade são desejadas e para isso, como pode ser observado nos resultados obtidos, fica evidente a necessidade de otimização da composição proporcional dos monômeros formadores da espuma (ABE, 2008).

A preparação e seleção de espuma de poliuretano, relacionando a densidade obtida, considerando diferentes composições de poliálcool e isocianato na sua formulação. A proporção de 50/30 (poliálcool/isocianato) resultou em menor encolhimento e defeitos na estrutura (SILVA *et al.*, 2012^a).

A hidrofobicidade de espumas de PU para várias concentrações de diferentes monômeros. As espumas oriundas da mistura de 80 % poliéster e 20 % poliéter, apresentaram os melhores resultados considerando as características físicas (densidade, estrutura dos poros, maleabilidade) de toda a unidade da estrutura polimérica (DMITRIENKO *et al.*, 1996).

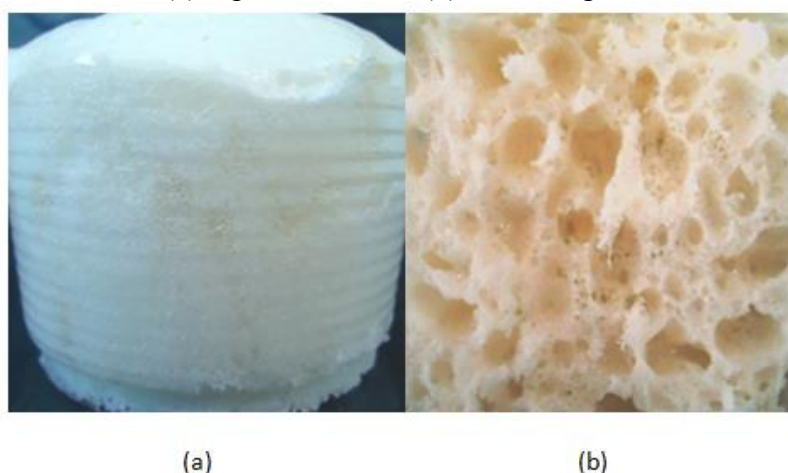
Após a avaliação visual das espumas obtidas, foi definida para a continuidade dos estudos a proporção de poliálcool:isocianato de 75/25 (Figura 14c), por apresentar

melhores características físicas (distribuição dos poros, maleabilidade e células uniformes).

4.2 AVALIAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DO IMOBILIZADO COM LIPASE CAL B LIOFILIZADA

Inicialmente foi conduzido um ensaio empregando a enzima na forma liofilizada. A quantidade de enzima, 10 % (m/m) foi previamente adicionada ao monômero polioliol. Após uma etapa de mistura, fez-se a adição do isocianato, deixando polimerizar por 5 minutos. A espuma formada apresentou uma boa uniformidade na estrutura polimérica, como pode ser observado na Figura 15.

Figura 15. Aspecto da espuma de PU formada juntamente com a lipase Cal B na forma liofilizada, (a) aspecto externo, (b) corte longitudinal.



Após a etapa de imobilização, o PU incorporado com enzima, foi fracionada em 3 partes (inferior, meio e superior), as quais, individualmente, foram submetidas a ensaios de atividade enzimática. Os resultados obtidos em termos de atividade de esterificação para as diferentes regiões da espuma contendo a lipase CAL B liofilizada imobilizada encontram-se apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados obtidos em termos de atividade de esterificação obtidas nas diferentes regiões da espuma com a lipase CAL B liofilizada imobilizada.

| Amostras | Atividade Enzimática (U/g) |
|----------|----------------------------|
| Superior | 31,394 |
| Médio | 63,782 |
| Inferior | 472,740 |

Como podemos observar, somente a parte inferior da espuma apresentou uma elevada atividade, as demais partes (meio e superior) apresentaram, em relação a parte inferior, uma baixa atividade enzimática, indicando que a enzima não apresentou uma distribuição uniforme no PU durante o processo de expansão da espuma. Esta distribuição heterogênea da enzima na espuma possivelmente esteja vinculada a falta de agente expansivo, como a água, que auxilia na formação da espuma (VILMAR, 2013).

4.3 AVALIAÇÃO DA CONFORMAÇÃO DO IMOBILIZADO COM LIPASE CAL B SOLUBILIZADA EM DIFERENTES SOLVENTES

A enzima, previamente solubilizada em água, álcool etílico ou acetona, a 0,16 % (m/v), foi adicionada ao poliols. Após a etapa de homogeneização fez-se a adição do isocianato, procedeu-se a mistura por 15 segundos, deixando polimerizar por 5 minutos. Após a etapa de polimerização, empregando a enzima solubilizada em água, álcool etílico e acetona, foi conduzida uma análise visual das estruturas poliméricas geradas. O ensaio conduzido empregando a acetona como solvente da enzima gerou uma estrutura polimérica rígida, compacta e bifásica, com duas fases distintas em termos de densidades, a fase inferior apresentou-se compacta e de coloração amarelada, indicando ser enriquecida com isocianato.

Além disto, não foi constatada atividade enzimática em nenhuma das fases. Os demais solventes (água e álcool etílico) conduziram a formação de espumas com estruturas poliméricas homogêneas, com boa maleabilidade e distribuição dos poros (Figura 16). No entanto, destes, somente o PU incorporado com a enzima previamente diluída em água apresentou atividade enzimática.

Figura 16. Aspecto da espuma de PU formada juntamente com a lipase Cal B na forma líquida (EH) sendo (a) Imobilizado na forma íntegra (b) Corte longitudinal do imobilizado (c) Imobilizado triturado.



Posteriormente repetiu-se a incorporação da enzima no PU empregando como precursor da enzima a solução aquosa. Após uma segmentação do suporte em duas parcelas verticais (1 e 2) e três horizontais (a, b e c) (Figura 16), para cada fração foi determinada a atividade enzimática, cujos os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade enzimática obtidas nas diferentes regiões da espuma com a lipase CAL B imobilizada, previamente diluída em água (EH).

| Fração | Atividade |
|--------|------------------------------|
| 1A | 958,55 ± 149,25 ^a |
| 1B | 895,55 ± 163,05 ^a |
| 2A | 917,90 ± 101,40 ^a |
| 2B | 947,68 ± 69,00 ^a |
| 3A | 911,17 ± 115,37 ^a |
| 3B | 900,37 ± 106,12 ^a |

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 0,5%.

Podemos observar uma similaridade de atividade para todas as partes da espuma de PU. Esta tendência, diferentemente do observada quando do emprego da enzima liofilizada, sugere uma distribuição homogênea da enzima durante a etapa de polimerização.

A imobilização em PU deve ocorrer, preferencialmente, pelo método de confinamento (inclusão de matriz) que consiste no aprisionamento das moléculas de enzimas entre as malhas do polímero, por ligações físicas entre enzima e suporte, diminuindo as possibilidades de desnaturação da proteína (GARCÍA-ARRAZOLA *et al.*, 2009, YUE *et al.*, 2004).

Os resultados demonstram que o processo de polimerização manteve a atividade da enzima, indicando que a proteína não foi desnaturada nem ocasionando alterações indesejáveis de conformação, além de permitir a permeabilidade do substrato entre a matriz do suporte e a saída do produto.

A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante para enzimas imobilizadas, enfatizando a importância da transferência de massa através da membrana (KEPMKA, 2012). A solubilização enzimática é selecionada de acordo com o tipo de reação, onde a quantidade de água e a solubilidade

dos substratos devem ser avaliadas e otimizadas, contribuindo na integridade estrutural e polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína (LIU, *et al.*, 2007).

A água na polimerização do PU pode atuar como agente expansivo, resultando na formação de segmentos rígidos de poliuréia e conseqüentemente, aumentando a dureza da espuma (VILMAR, 2013). Esta propriedade pode também estar relacionada aos radicais livres existentes no pré-polímero e a liberação de dióxido de carbono durante o processo de polimerização (ZAREVÚCKA, 1996; SUSLA *et al.*, 2007). Dentre os fatores que afetam a interação enzima e espuma de PU destacam-se a hidrofobicidade da espuma e a estabilidade de armazenamento (LEJEUNE *et al.*, 1996).

A quantidade de água durante a polimerização, auxilia um ataque nucleofílico ao complexo formado quando a lipase age no monômero. Em relação à água, sua miscibilidade em relação aos monômeros pode estar relacionada a fase homogênea da água, que compete com as hidroxilas primárias do poliálcool reativo, incorporando-se aos segmentos rígidos de poliuréia, aumentando seu tamanho e, devido a sua trifuncionalidade, forma estruturas reticuladas impedindo o alinhamento macromolecular e formação de ligações hidrogênio (ALBERTSSON *et al.*, 2008).

Além disso, as hidroxilas primárias do poliálcoolpoliéster reagem com o isocianato, formando prepolímeros terminados em NCO, que reagem posteriormente com a água e outro grupo isocianato do segmento rígido, unindo os segmentos rígidos com o poliálcool e impedindo a separação de fase, originando uma espuma com boa distribuição de enzima em seu interior. (ALBERTSSON *et al.*, 2008).

Dessa forma, a polimerização irá responder de forma diferente de acordo com a quantidade de água adicionada. A relação inversa entre a massa molar e quantidade de água. Quantidades baixas de água conduzem a formação de polímeros de massas molares maiores, ou seja, polímeros com estrutura mais compactas, irregulares, bem resistentes e com deformação permanente (THURECHT *et al.*, 2006).

4.4 RENDIMENTO

O rendimento reacional representa a relação entre a Atividade Total Teórica (U_T), calculada considerando a quantidade de enzima livre (12,8 mg) empregada na etapa de incorporação, e a Atividade Total Experimental ($U_{TExp.}$), calculada considerando a atividade total do suporte PU incorporado com a enzima (8,0g).

Os valores de Atividade Total Teórica (U_T) e Atividade Total Experimental

($U_{\text{TEp.}}$) obtidos para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente, encontram-se apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Atividade inicial da CAL B livre (EH) e imobilizada em PU

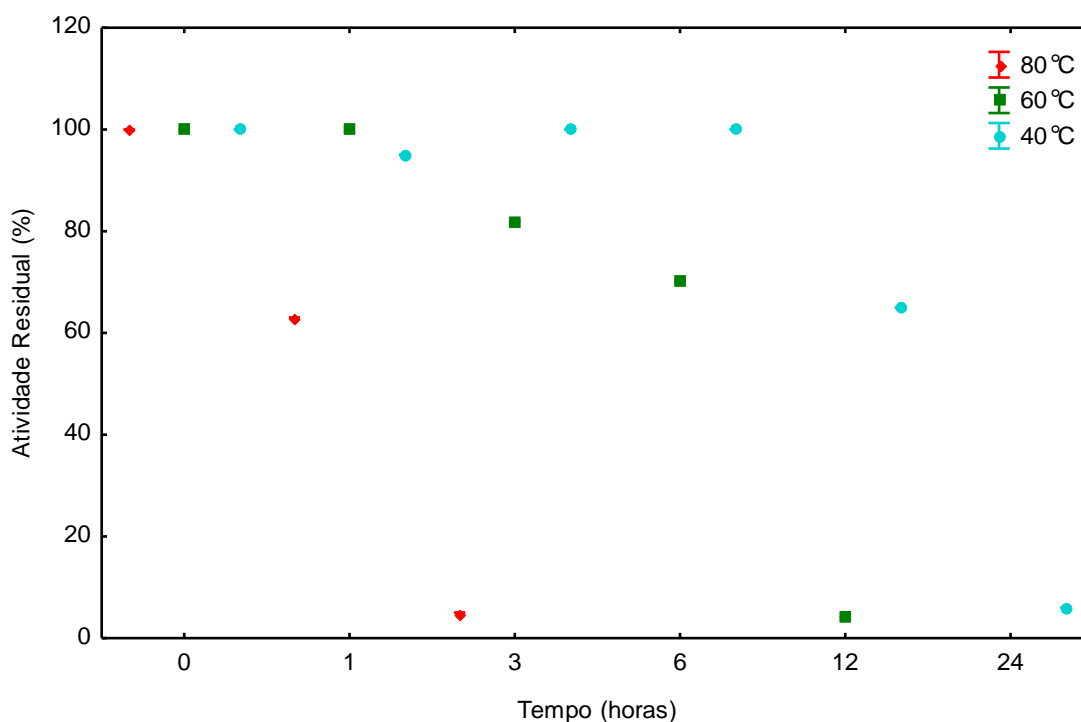
| Enzima | Atividade (U) | Rendimento de Imobilização (%) |
|-------------|---------------|--------------------------------|
| Livre | 1020,0 | ----- |
| Imobilizada | 2.554,7 | 250 |

Observa-se um aumento de 250 % da atividade da enzima imobilizada em relação à livre. Estes resultados sugerem um efeito benéfico da imobilização sobre a atividade da enzima. Esta tendência pode estar relacionada com varias fatores como, a disponibilização facilidade do acesso de novos sítios ativos, possibilidade da reutilização do biocatalisador imobilizado, facilidade na separação do meio reacional, sem contaminação do produto final pela enzima e melhor controle do processo.

4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ENZIMA LIVRE

Os resultados da estabilidade da enzima livre a diferentes temperaturas encontram-se apresentado na Figura 17.

Figura 17. Estabilidade da Lipase (CAL B) livre (EH) submetida a temperaturas de 40 °C (EL_40 °C), 60 °C (EL_60 °C) e 80 °C (EL_80 °C).



Observa-se uma diminuição da atividade com o tempo de contato para todas as temperaturas avaliadas, bem como uma relação direta com a temperatura. As maiores temperaturas apresentaram desativações mais rápidas. Para a EL_80 °C a inativação foi total com 3 horas de contato. Para as EL_60 e EL_40 °C a inativação total somente foi observada com 12 e 24 hs de contato, respectivamente.

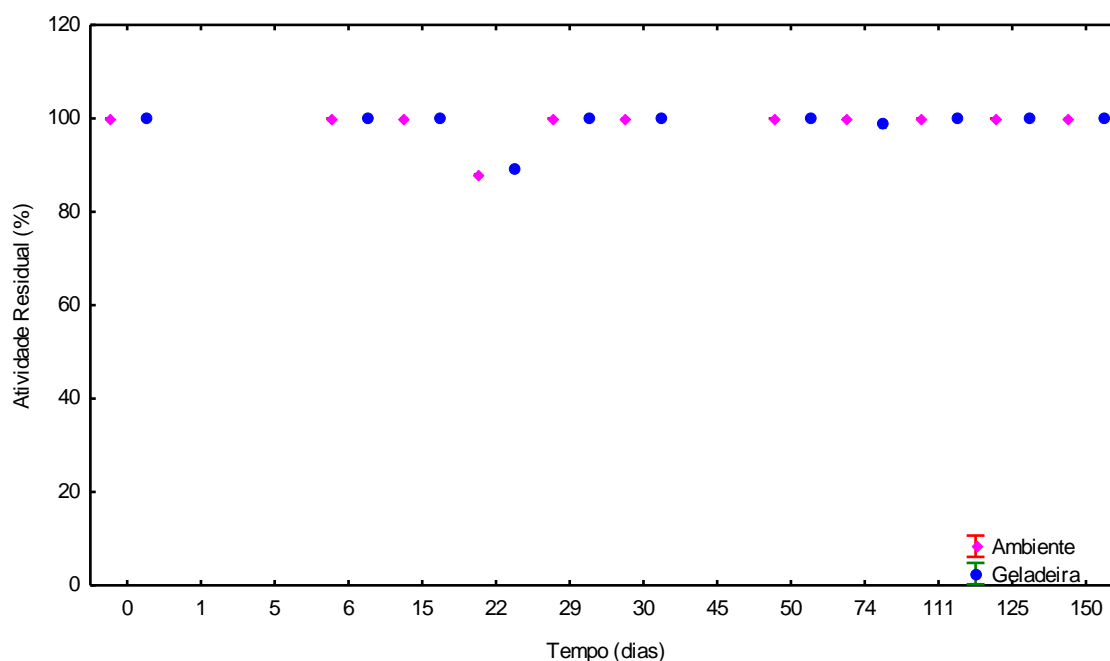
A avaliação da estabilidade de extratos enzimáticos de farelo de arroz, farelo de soja e bagaço de cana à temperatura ambiente observaram uma manutenção da estabilidade durante 60 dias (FERRAZ *et al.*, 2010).

As enzimas na sua forma solúvel são moléculas proteicas complexas e de certa flexibilidade, sua atividade catalítica prove uma estrutura altamente ordenada, muito delicada e frágil. Se a molécula absorve muita energia, ela pode sofrer mudanças conformacionais nos seus sítios ativos, muitas vezes irreversíveis, podendo até desnaturar totalmente enzima (MARTINI, 2007; JÚNIOR, 2008; INOUE, 2011).

4.6 ESTABILIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA EM PU ARMAZENADA EM CONSTANTE DE DESATIVAÇÃO TÉRMICA

A estabilidade do imobilizado (PU + Enzima) na forma seca, armazenada a temperatura ambiente (ASA) e geladeira (ASG) é apresentada na Figura 18.

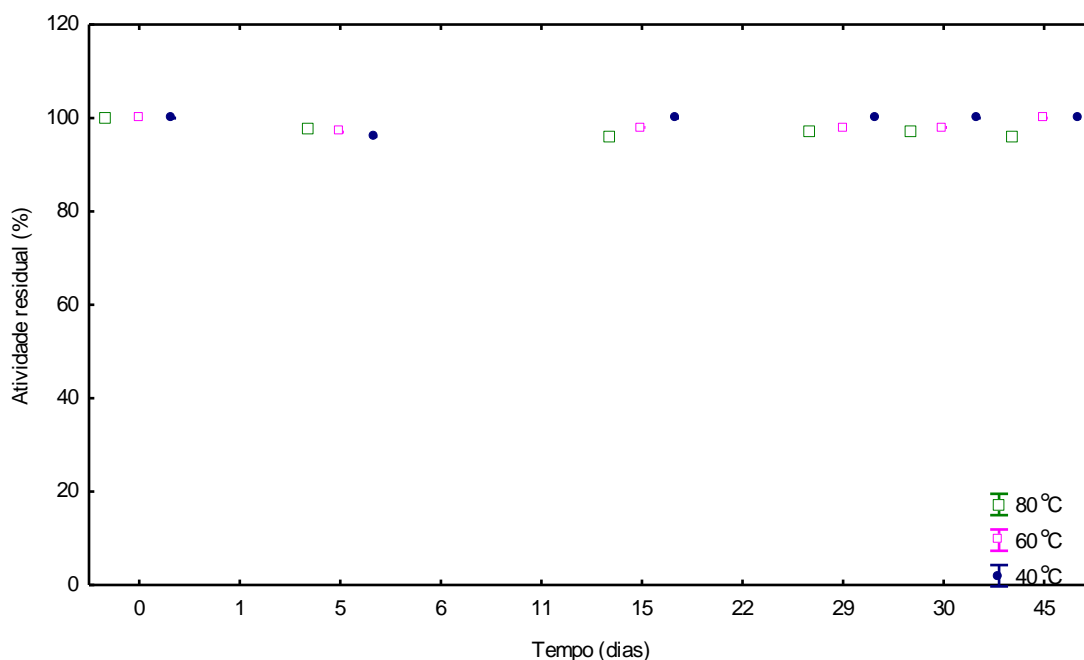
Figura 18. Estabilidade da Lipase Cal B imobilizada submetida a temperatura ambiente (ASA-25 °C) e de geladeira (ASG-(2-8 °C)).



O resultado do comportamento da enzima imobilizada em PU após 150 dias de armazenamento apresenta comportamento estável tanto para temperatura ambiente (ASA) e de geladeira (ASG). Em ambos os casos observa-se uma atividade residual de 100%, ou seja, não ocorreu perda de atividade residual relacionada com a dosagem da atividade realizada logo após a imobilização. A enzima imobilizada (ASG) apresentou também maior estabilidade em relação à livre (ELG), quando estas foram estocadas em temperatura de geladeira.

O experimento usando a enzima CAL B imobilizado em Accurel (polipropileno) e poliestireno aumentou de três vezes no tempo de estabilidade em relação a enzima livre, que apresentou um tempo de meia vida de apenas 5 dias (BRANCO *et al.*, 2006). Já o uso da invertase imobilizada em PU obteve uma estabilidade por um período de 60 dias, sem perda considerável atividade (68,5 % de retenção da atividade) (CADENA *et al.*, 2010). A Figura 19 apresenta o desempenho do imobilizado à seco (AS) submetido a altas temperaturas de armazenamento.

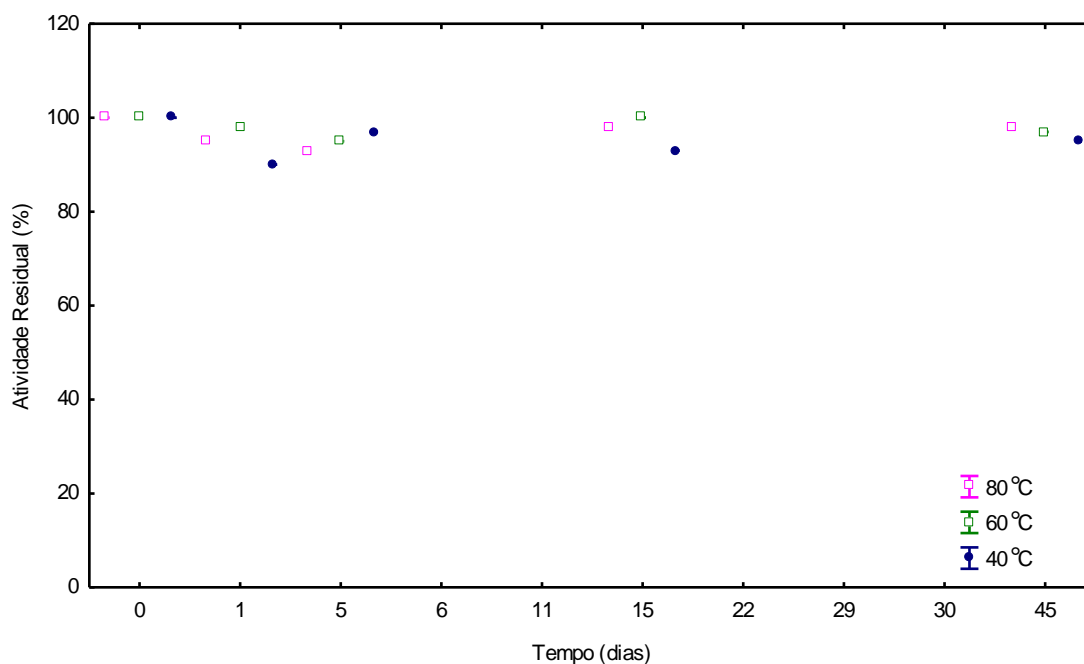
Figura 19. Estabilidade da Lipase (CAL B) imobilizada submetida a temperatura AS_40 °C, AS_60 °C e AS_80 °C.



Independente da temperatura de armazenamento (AS_40, 60 ou 80 °C), a enzima imobilizada manteve sua atividade residual acima de 95 % pelo período avaliado (45 dias). Os resultados demonstram um ganho significativo de estabilidade a altas temperaturas em relação a enzima livre, a qual apresentou inativação total em 2, 12 e 24 hs, para as temperaturas de 40, 60 e 80 °C, respectivamente.

Esse fato pode ser decorrente do aumento da estabilidade do catalisador ou modificações na estrutura do suporte favorecendo a estabilidade do imobilizado (OLIVEIRA, 2008). A Figura 20 mostra a estabilidade do imobilizado a altas temperaturas, avaliando o armazenando em meio reacional.

Figura 20. Estabilidade da Lipase (CAL B) imobilizada imersa ao meio reacional submetida a temperatura (AM_ 40°C, 60°C e 80°C) no decorrer nos dias de estocagem.



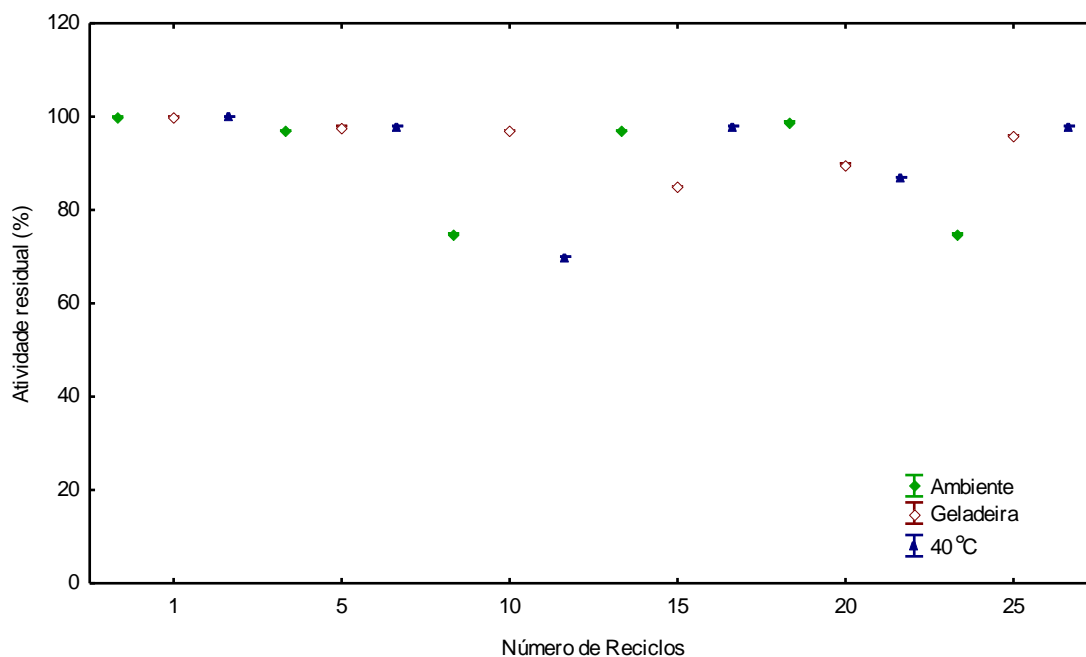
Similar aos ensaios anteriores, para as três temperaturas avaliadas, a atividade residual se manteve acima dos 90% durante o período acompanhado (45 dias). Os resultados demonstram que o meio reacional, o qual contém ácido oléico e etanol como princípios ativos, não interferiu na estabilidade da enzima imobilizada em PU, demonstrando assim, a potencialidade da aplicação em fluxo contínuo, em diferentes temperaturas, do suporte produzido.

4.7 AVALIAÇÃO DO REUSO DA LIPASE IMOBILIZADA

Outro parâmetro importante em reações catalisadas por enzimas é a avaliação da reutilização do biocatalisador, visando diminuir os custos de todo o processo. A Figura 21 apresenta os resultados obtidos para os ciclos conduzidos com as amostras em meio reacional. Foram conduzidos distintos experimentos onde, entre os ciclos (a cada 24 hs) e o imobilizado foi armazenado em distintas condições:

- i) no próprio meio reacional à temperatura ambiente (RMRA), em geladeira, 2-8 °C (RMRG) e à 40 °C (RMR_40 °C);
- ii) submetido a uma etapa de lavagem para remoção de substratos do PU, também a temperatura ambiente (RLETA), geladeira (RLETG) e a 40 °C (RLET_40 °C) denominado neste estudo como a seco.

Figura 21. Comportamento da Lipase (CAL B) imobilizada submetida à ciclos e a diferentes temperaturas de armazenagem ambiente (RMRA), geladeira (RMRG 2-8 °C) e 40 °C (RMR_40 °C).

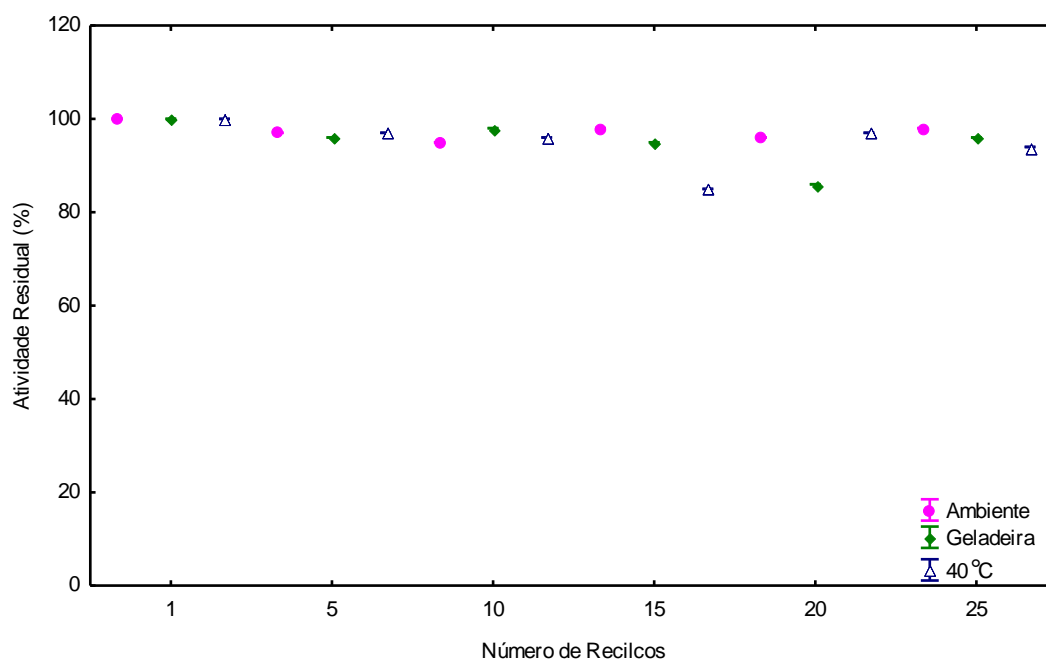


Em 30 ciclos os imobilizados a 40 °C, RMR_40 °C e o RLET_40 °C, mantiveram mais de 87 % e 95 %, respectivamente, de sua atividade residual, enquanto que os armazenados em geladeira (2-8 °C) (RMRG) e (RLETG) apresentaram atividades superiores a 83 % e 98 %, respectivamente.

Um estudo com Novozym 435 em síntese enzimática e esta permaneceu ativa por 15 ciclos com rendimento de 100 % a temperatura de 40 °C (BLANCO, 2004) A enzima *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase, pré-tratada com lactose (para evitar a perda de atividade durante o processo de imobilização), e glutaraldeído, utilizado como um ligante para imobilizar β -galactosidase, sobre a superfície de um gel de sílicamostrou, observaram uma melhor capacidade de reutilização em relação a enzima imobilizada sem pré-tratamento, com 63,9 % da sua atividade original, após 10 reutilizações (SONG *et al.*, 2010).

Os imobilizados armazenados a temperatura ambiente apresentaram tendências distintas, em meio reacional (RMRA) após 35 ciclos, apresentou uma atividade residual, de 65 %, enquanto que o conduzido a seco (RLETA) manteve os 100 %. Figura 22 apresenta os resultados obtidos para os reciclos com as amostras a seco.

Figura 22. Comportamento da Lipase (CAL B) imobilizada submetida à ciclos e a diferentes temperaturas de armazenagem ambiente (RLETA), geladeira (RLETG 2-8°C) e 40 °C (RLET_40 °C).



A *Monascus* imobilizada em PU, uma atividade residual de 60 % após 17 reciclos, a metade do presente estudo (QUEZADA *et al.*, 2009). Para a lipase de *Cândida rugosa* imobilizada em PU e aplicada na esterificação do ácido palmítico com álcool cetílico, observaram que o biocatalisador retia 80 % de sua atividade original após 15 reciclos (GUNCHEVA *et al.*, 2011). As células de *Bacillus sp.* imobilizadas em alginato e em espuma de PU apresentaram maior degradação de ftalato do que células livres, podendo ser reutilizados por mais de 12 e 24 ciclos, respectivamente (PATIL *et al.* 2006).

4.8 AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA LIPASE CAL B IMOBILIZADA NA CATÁLISE DE REAÇÕES DE SÍNTESE

Nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas reações de esterificação enzimática a fim de verificar o comportamento da CAL B imobilizada em PU para reações de esterificação, já que a mesma apresenta elevada atividade, estabilidade e capacidade de reciclo para estas reações.

Na Tabela 12 são apresentados os resultados relativos as conversões obtidas nas reações de síntese enzimática dos ésteres geranil oleato, geranil propionato e etil oleato.

Tabela 12. Conversões reacionais obtidos nas reações catalisadas pela CALB imobilizada em PU na esterificação de geraniol com ácido oleico e propiônico do ácido oléico e etanol.

| Enzima CAL B | Conversão (%) |
|--------------------|---------------|
| Etilo oleato | 83,4 |
| Geranil oleato | 31,2 |
| Geranil propionato | 18,3 |

A aplicação do imobilizado nas reações de produção de geranil propionato e geranil oleato resultou em conversões de 18,3% e 31,2%, respectivamente e da síntese de oleato de etila em 83,2%. Os resultados demonstram a potencialidade do suporte avaliado, principalmente para o oleato de etila. Cabe salientar que a reação pode ser conduzida a temperaturas mais elevadas, permitindo aumentar o rendimento reacional.

Alguns estudos apresentados na literatura relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e álcoois. A otimização na produção de geranil propionato na condição de razão molar 3:1 (geraniol:ácido propiônico) e 10% de enzima Novozym 435, alcançando uma conversão média de 94,6% de produto (PAROUL, 2011).

Os estudos realizados feitos nas condições reacionais para a produção de geranil butirato e geranil caproato em sistemas com n-hexano e lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada (YEE *et al.*, 1997). Conversões de 96 e 99% foram alcançadas para citronelilbutirato e geranil caproato, respectivamente, com concentração de enzima de 15% (m/m do substrato), temperatura reacional entre 30 °C e 50 °C, adição 2% de água depois de 24 horas de incubação.

Um estudo realizado resultou resultados satisfatórios para conversões em geranil propionato quando catalisadas por EEB (32,2%) e EEBI (34,4%). Para a lipase comercial de pâncreas suíno, maior conversão foi obtida, quando utilizada ECL (35,9%) na esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico (FERRAZ, 2012).

A comparação dos resultados de esterificação entre os diferentes trabalhos encontrados na literatura em muitos casos é feita utilizando-se a conversão em éster (%) como parâmetro. Entretanto, devido às diferentes concentrações de substratos utilizadas, este parâmetro não espelha bem a eficiência da enzima. Em termos de síntese, com baixas concentrações de substrato, a enzima pode converter 100% do mesmo rapidamente. Portanto, outro parâmetro, produtividade em éster, que leva em consideração o tempo de conversão por massa de biocatalisador, pode ser empregado para propiciar melhor comparação entre os resultados.

Diversos trabalhos de pesquisa estão sendo realizados, visando a otimização e o desenvolvimento de processos em escala industrial para a síntese de diversos ésteres de valor comercial. Tais reações são de extrema importância para o desenvolvimento de novas rotas de processo, para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos ampliando, simultaneamente, o potencial de aplicação das enzimas em processos. Como exemplo, processos de biotransformação para lipases em reações de esterificação para obtenção de produtos de interesse industrial do setor de óleos e gorduras e alimentícia em processos de produção de margarinas, óleos comestíveis, queijos e manteigas com características nutricionais e funcionais desejáveis (MADALOZZO, 2011).

A síntese enzimática de ésteres envolvendo lipases apresenta diversas vantagens, pois pode garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas da ambiente, dependendo da metodologia e da enzima aplicadas, o que proporciona produtos de qualidade, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos (TIGGEMANN *et al.*, 2012).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos na avaliação das proporções dos monômeros para a elaboração do suporte do PU, a proporção de 25/75 % de polioliol e isocianato foi selecionada para a formação da espuma, pois apresenta uma estrutura polimérica homogênea, visivelmente com boa maleabilidade e distribuição dos poros.

A avaliação da conformação do imobilizado, demonstrou que ao empregar a enzima liofilizada somente a parte inferior da espuma apresentou atividade, indicando que a enzima não apresentou uma distribuição uniforme no PU.

A enzima solubilizada em água, álcool etílico e acetona, apresentaram quanto à conformação das estruturas poliméricas diferenças significativas. A acetona como solvente da enzima gerou uma estrutura polimérica rígida, compacta e bifásica, com ausência de atividade enzimática nas distintas fases. Os demais solventes (água e álcool etílico) conduziram a formação de espumas com estruturas poliméricas homogêneas, com boa maleabilidade e distribuição dos poros, contudo, somente o PU incorporado com a enzima diluída em água (EH) apresentou atividade enzimática.

O processo de imobilização proporcionou um aumento de 250 % da atividade da enzima imobilizada em relação à livre. Estes resultados sugerem um efeito benéfico da imobilização sobre a atividade da enzima.

Os resultados demonstram que o processo de polimerização manteve a atividade da enzima, indicando que a proteína não foi desnaturada nem ocasionou alterações indesejáveis de conformação, além de permitir a permeabilidade do substrato entre a matriz do suporte e a saída do produto.

A estabilidade do imobilizado apresentou estabilidade de 95 % de atividade residual durante 150 dias submetidos à seco em temperatura ambiente (ASA) e de geladeira (ASG) (2-8 °C). Já aos resultados a altas temperaturas (40 °C, 60 °C, e 80 °C) resultou em 90% de atividade residual após 45 dias, tanto para estocagem do imobilizado à seco (AS_40 °C, AS_60 °C e AS_80 °C) como imerso ao meio reacional (AMR_40 °C, AMR_60 °C, AMR_80 °C). Os resultados demonstraram que a permanência em meio reacional juntamente com as altas temperaturas praticamente não afetaram a estabilidade do imobilizado no período avaliado. A capacidade de ciclos reacionais foi de 35 ciclos quando o imobilizado foi mantido à seco (RLETA) entre as

bateladas e/ou imerso no meio reacional (RMRA), em temperatura ambiente, e 30 ciclos quando armazenadas à temperatura de geladeira (RMRG e RLETG). Ambas as formas de manutenção entre os ciclos e bem como a 40 °C (RMR_40 °C e RLET_40 °C) com o mesmo comportamento

A aplicação do imobilizado nas reações de produção de geranil propionato e geranil oleato resultaram nas conversões de 18,3 % e 31,3 % respectivamente e da síntese de oleato de etila em 83,2 %, indicando assim uma promissora técnica para estudos sobre a aplicação do imobilizado em PU em fluxo contínuo para síntese de ésteres.

5.2 SUGESTÕES

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser apontadas:

- ❖ Avaliar o comportamento da *Candida antartica* do tipo B (Novozymes) livre em reações de síntese.
- ❖ Avaliar o efeito da ativação enzimática em alta pressão (CO₂, GLP), sobre a atividade catalítica da enzima.
- ❖ Avaliar as diferentes proporções de água na diluição da enzima *Candida* o efeito da ativação enzimática em alta pressão (CO₂, GLP), sobre a atividade catalítica da enzima.
- ❖ Calcular a produtividade enzimática da *Candida antartica* do tipo B (Novozymes) em PU.
- ❖ Avaliar o efeito da ativação em ultrassom sobre a atividade catalítica da enzima.
- ❖ Avaliar o ensaio em um sistema de fluxo contínuo.
- ❖ Fazer uma reação em escala real.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABDELMAJEED, N.; KHELI, O.; DANIAL, E., **Immobilization technology for enhancing bio-products industry**, *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 71, p. 13528-13539, 2012.
- ABE, R. M., **Estudo do Poliuretano de Alta Densidade para Proteção Externa de Oleodutos Térmicos**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ADACHI, K.; KOBAYASHI, M.; TAKAHASHI, E., **Effect of application of lignin and/or chitin to soil inoculated with *Fusarium oxysporum* on the variation of soil microflora and plant growth**, *Soil Science and Plant Nutrition* 33:245-260, 2005.
- ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W., **Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antarctica* lipases**, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3177-3180, 2005.
- AEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications lipases , *Annual Review of Microbiology*, v.53, p. 315-351, 1999.
- AGNELLI, J.A.M., **Síntese e Propriedades de Poliuretanos obtidos a partir do Polibutadieno Líquido Hidroxila do e seus Derivados Hidrogenados**, 1983, Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Polímeros – Instituto de Macromoléculas, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1983.
- AKCELRUD, L., **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**, Ed. Manole, Barueri, São Paulo, 2007.
- ALBAYRAK, N.; YANG, S., **Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on Tosylated Cotton Cloth**, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 371-383, 2002.
- ALBERTSSON, A. C.; SRIVASTAVA, R. K., **Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization**, *Advanced Drugs Delivery Reviews*, n. 60, p.1077-1093, 2008.
- ALBIQUIM, Associação Brasileira da Indústria Química, disponível em: <http://ebiquim.org.br/poliuretanos/quimicamente.htm>, acesso em 20 de fevereiro de 2013.

- ALMEIDA, R.V.; ALQUÉRES, S.M.C.; LARENTIS, A.L.; RÖSSLE, S.C.; ALMEIDA, W.I.; CARDOSO, A.M.; BISCH, P.M.; ALVES, T.L.M.; MARTINS, O.B. **Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus***, *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.1128–1136, 2008.
- ALVARENGA, R. R., **Adição de fitase em rações com diferentes níveis de energia metabolizável, proteína bruta e fósforo disponível para frangos de corte de 1 a 21 dias**, *Ciência Animal Brasileira (Brazilian Animal Science)*, v. 12, n. 4, p. 602-609, 2011.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J.; *Biotechnol. Lett.* 21, 31, 2000. AL-ZUHAIR, Z., **Production of Biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetics study**, *Biotechnology Progress*, v. 21, p. 1442-1448, 2013
- AL-ZUHAIR, Z., **Production of Biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetics study**, *Biotechnology Progress*, v. 21, p. 1442-1448, 2013.
- ANDERSON, E. M.; LARSSON, K.M.; KIRK, O., **The use of *Candida Antarctica* Lipase B in Organic Synthesis**, *Biocatal Biotransform*, vol 16, 181, 1998.
- ARAÚJO, L. T. C de, **Aplicações de Lipases**, Monografia apresentada ao programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2009.
- ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M.S.; SINISTERRA, J.V., **Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: as an additive in laundry detergent formulations**, *Process Biochemistry*, v. 35, p. 809-814, 2000.
- AZEVEDO, J. G. W., **Estudo das condições de Imobilização de *Streptomyces Olindensis* ICD20 em alginato de cálcio, visando a produção de retamicina**, p 109, São Paulo, SP, 2005.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X., **"Bioreactors with immobilized lipases"**, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BARON, A. M, **Preparação e caracterização de lipases, Imobilizadas para utilização em biocatálise**, Curitiba, 2008.
- BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A.; VALENTINE, W.M., *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract*, 5:345-361, 1997.

- BERNARDES, O.L.; BEVILAQUA, J.V.; LEAL, M.C.M.R.; FREIRE, D.M.G.; LAGNONE, M.A.P., **Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase**, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 32:136-140, 105-114, 2007.
- BLANCO, R.M.; TERREROS, P.; PÉREZ, M. F.; OTERO, C.; GONZÁLEZ, G., **Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts**, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 83-93, 2004.
- BÓDALO, A.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M. F.; MONTIEL, M. C.; GÓMEZ, M.; ORTEGA, S., **Screening and selection of lipases for the enzymatic production of polyglycerol polyricinoleate**, *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 46, p. 217-222, 2009.
- BOLSONI, E., **Estudo do Reaproveitamento e Reutilização das Espumas Rígidas de Poliuretano Pós-Consumo**, Tese apresentada como requisito parcial a obtenção de grau de Doutor. Área de concentração: Engenharia e Ciência de Materiais, Programa de Pós Graduação em Engenharia PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L., **Enzimas em Biotecnologia**, Rio de Janeiro, Interciência, cap. 6, p.124 – 147, 2008.
- BOSCOLO, M., **Imobilização de lipases em quitosana modificada e em suportes hidrofóbicos para produção de biodiesel etílico**, 1 de setembro de 2012 - 28 de fevereiro de 2012.
- BRADY, D.; JORDAAN, J., **Advances in enzyme immobilisation**, *Biotechnology Letters*, v.31, p.1639-1650, 2009.
- BRÍGIDA, A.I.S., **Estudo da Imobilização de lipase do tipo B de *Cândida antarctica* utilizando fibras da casca de côco verde como suporte**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- BUCALÁ, V.; FORESTI, M.L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M. L.; BRIOZZO, M.; e BOTTINI, S., **Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions**, *Enzyme Microbial Technol.*, v. 38, p. 914-920, 2006..
- BUNGAY. H., disponível em <http://www.cape.canterbury.ac.nz/> visitado em agosto 2003.
- CABRAL, J. M. S.; BARROS, M. R. A.; GAMA, M., **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel, p. 47-57, 2013.

- CADENA, P. G.; JERONIMO, R. A. S, MELO, J. M.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B., **Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron**, *Bioresource Technology*, v.101, p.1595-1602, 2010.
- CALLISTER, J. W. D., **Ciência e Engenharia dos Materiais – Uma Introdução**. LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A, Rio de Janeiro, 2000.
- CANAUD, C., **Tecnologia do Poliuretano**, Dossiê Técnico, Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, REDETEC, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, disponível em <http://www.respostatecnica.org.br>, visitado em janeiro de 2013, Sede Tecnologia, Rio de Janeiro, junho 2007.
- CANEVAROLO, Jr.; SEBASTIÃO, V., **Ciência dos Polímeros – Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros**, Artliber Editora. São Paulo, 2002.
- CAO. L. (a), **Immobilised enzymes: science or art**, *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 9, p. 217-226, 2005.
- CAO. L. (b), **Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design**, The Netherlands: Wiley, pp.531, 2005.
- CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B., *Química Nova*, v. 32, nº1, p.175-187, 2009.
- CARLI, I.C., **Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido**, Dissertação (Mestrado), Universidade Regional de Blumenau-FURB, Blumenau, 2006.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M.; *Quim. Nova*, 26, 75, 2003.
- CASTILHO, L. R., **Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells**, *série Fortschritt-Berichte*, VDI-Verlag, Alemanha, 2003.
- CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A., *Química Nova*. 18, 544–554, 1995.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C., **Modificações de óleos e gorduras por biotransformação**, *Química Nova*, v. 27(1), p. 146-156, 2004.
- CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P., **Imobilização de enzimas e sua estabilização**, In: BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; *Enzimas em biotecnologia Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, cap.6, p.123-151, 2008.

- CATAL. B., Enzyme 11, 567–577, **Polyurethane Technology**, John Wiley & Sons, New York, 2010.
- CAVALCANTI, P.F.F. , **Aplicação de Reatores UASB e lagoas de polimento no tratamento de esgoto doméstico**, Campina Grande, PB: Santa Marta, 172p. 2009.
- CHIBATA, I., **Immobilized Enzymes – Research and Development**, *New York: John Wiley & Sons*, p. 71, 1978.
- CORREIA, A. C.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S., **Produção de Emulsionantes através da Glicerólise de Óleo de Bagaço de Azeitona Catalisada pela Lipase da *Candida Rugosa*, Imobilizada em Espumas de Poliuretano**. *Millenium*, 41, julho-dezembro, Pp. 7-15. 2011.
- COUTO, S. R.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M. R.; SANROMÁN, A., **Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium***, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Berlin, v. 23, n. 3, p. 287-293, 2000.
- DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V., **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**, *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITE, R.M., CHIELLINI, E., **Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications**, *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RANI, Y.; RAJARAM, S., **Enzyme immobilization: an overview on techniques and support**, *Materials*, Received: 2 February 2012 / The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com, 3Biotech (2013) 3:1–9, Accepted: 20 May 2012 / Published online: 6 June 2012.
- DELPECH. M. C.; COUTINHO. F.M.B., **Poliuretanos como Materiais de Revestimento de Superfície**, Instituto de Macromoléculas, Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, C.P. 68525, Polímeros: Ciência e Tecnologia Rio de Janeiro, janeiro-março de 1999.
- DMITRIENKO, S. G., **Sorption of sodium dodecylsulfate and cetyltrimethylammonium bromide on polyurethane foams**, *Mendeleev Communications*, p.137-139, 1996.

- DRAUZ, K.; GRÖGER, H.; MAY, O., **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis**, Third, Completely Revised and Enlarged Edition, Wiley-Vch, vol 1, Germany, 2012.
- EMSLEY, J., **Moléculas em exposição**, São Paulo: Edgard Blucher, p. 120-121, 2001.
- ENRICO, “Enzimas”, “**Fatores que afetam a atividade das enzimas**”, disponível em http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica11.php, acesso visitado em 28 fevereiro de 2012.
- FABER, K., **Biotransformations in Organic Chemistry**, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
- FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. **Hydrogen peroxide detection system consisting of chemically immobilised peroxidase and spectrometer**, *Process Biochemistry*, v. 40, n. 11, p. 3441- 3445, nov. 2000.
- FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F., **Técnicas de Imobilização de Enzimas**, Revista Processos Químicos, Junho de 2010.
- FERRAZ, L. I. R., **Aplicação de Lipases na Catálise de Reações de Interesse**, Exame de Qualificação para o Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim, Erechim, RS, Julho de 2012.
- FERRAZ, L.R.; OLIVEIRA, D.S.; SILVA, M.F.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D., **Produção de lipase microbiana por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais**, 3º Simpósio de Segurança Alimentar. *Anais 3º Simpósio de Segurança Alimentar*, Florianópolis, 2010.
- FERREIRA, E. M. de, **Uso de Espuma de Poliuretano na Extração de Índio de Meio Iodeto**, Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio, Rio de Janeiro, fevereiro de 2005.
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L., **Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder**, *Catalysis Today*, v. 107-108, p. 23-30, 2005.
- FREIRE, D. M. G.; SANT’ANNA, Jr. G. L., “**Hydrolysis of starch with immobilized glucoamylase: a comparison between two types of expanded-bed reactor**”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.26, p.23 - 33, 1990.

- FURIGO, A. J., **Enzimas e suas Aplicações Cinética Enzimática**, Disciplina de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, junho 2001.
- GARCÍA-ARRAZOLA, R.; LÓPEZ-GUERRERO, D. A.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E., **Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide**, *Journal of Supercritical Fluids*, 2009.
- GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C., **Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance**, *Advanced Synthesis & Catalysis*, v.353, p.2885-2904, 2011.
- GÓMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R., **Immobilization of Chitosan-modified Invertase on Alginate coated Chitin Support via Polyelectrolyte Complex Formation**, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 22-27, 2005.
- GÓMEZ, M., **Functionality of different emulsifiers on the performance of breadmaking and wheat bread quality**, *Eur. Food Res. Technol.*, Berlin, v. 219, n. 2, p. 145-150, 2004.
- GONÇALVES, L. R. B., **Estudo do processo de obtenção de etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 114 p, 1996.
- GONÇALVES, F.A.G., **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**, Belo Horizonte, Dissertação de Mestrado. Depto. de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.
- GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M., **Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review**, *Czech Journal of Food Science*, v. 26, n^o1, p.1-14, 2008.
- GUISAN, J. M., **Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, Methods in Biotechnology**, Humana Press, 2001.
- GULATI, R., **“Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications”**, *Pure and applied chemistry* 77.1 251-262, 2005.
- GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKIVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOV, N., **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorus-**

- containing polyurethanes: application in wax ester synthesis**, *Process Biochem*, 46, 923–930, 2011.
- HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T. S.; TAMALAMPUDI, A.; KONDO, H.; NODAC, H.; FUKUDA, **Biodiesel fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles**, *Biochem. Eng. J.*, 34 pp. 273–278, 2007.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A., **Industrial applications of microbial lipases**, *Enzyme and Microbial Technology*, 39:235-25, 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A., **Industrial applications of microbial lipases**, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N. N., **Lipase catalysed transesterification of 2-o-benzylglycerol with vinyl acetate: solvent effect**, *Chem. Eng. J.*, 94 pp. 1–10, 2002.
- H-KITTIKUN, A.; KAEWTHONG, W. and CHEIRSILP, B., **Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS**, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 40, no. 1, p. 116-12, 2008.
- ILLANES, A., “**Biotecnología de enzimas**“, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, 1994.
- INOUE, D.Y; SILVA, G. S. dos; DORS, G.; FURIGO - JUNIOR, A.; CASTRO, H. F. C de, **Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma**, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, DOI: 10.4025/actascitechnol.v.33i2.7594, *Acta Scientiarum. Technology Maringá*, v. 33, n. 2, p. 197-203, 2011.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M.T., **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology**, *Tibtech*, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T., “**Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases**”, *Ann. Rev. Microbiol.*, v.53, pp. 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, M.T., **Lipases for biotechnology**, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JAGANATHAN, H.; RICHARD, L.; GIESECK, ALBENA I., “**Characterizing proton relaxation times for metallic and magnetic layer-by-layer-coated, DNA-templated nanoparticle chains.**” *Nanotechnology* 21.24, 245103, 2010.

- JEGANATHAN, J.; GEORGE N.; AMARJEET B., "**Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase**", *Journal of hazardous materials* 145..1, 127-135, 2007.
- JESUS, P.C.; SILVA, P.L.F.; JUAREZ, J. J.; NASCIMENTO, M.G., **Enantioselective esterification of 2-methylpentanoic acid catalysed via immobilized lipases in chrysotile and microemulsion-based gels**, *Synth. Commun.* v 28, nº15, p. 2893-2901, 1998.
- JÚNIOR, A., "**Imobilização de Lipase de *Candida Antarctica B* em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**", Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, 2008.
- KAMBOUROVA, M., "**Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic, *Bacillus stearothermophilus*, MC 7.**" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22.5, 307-313 2003.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N., **Lipase promiscuity and its biochemical applications**, *Process Biochemistry*, 48:1-15, 2012.
- KATSOURA, M.H.; POLYDERA, A.C.; TSIRONIS, L.; TSELEPIS, A.D.; H. STAMATIS, **Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency**, *J Biotechnol*, 123, pp. 491–503, 2006.
- KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S., **Enzyme Immobilization**, *Journal Biotechnology*, v.7a, p.347-404, 1987.
- KIELING, D. D., **Aspectos Gerais, Enzimas**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, julho de 2002.
- KILINC, A.; ONAL S.; TELEFONÇU A., **Chemical attachment of porcine lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride**, *Process Biochem* v.38, p.641-647, 2002.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C.C., **Industrial enzyme applications**, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p.345-351, 2002.
- KLOSS, J. R., **Síntese e Caracterização de Poliuretanos Biodegradáveis à base de póli(εCaprolactona)Diol**, Curitiba, 2007.

- KOSE, O., **Immobilized *Candida Antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium**, *Bioresource Technology*, Essex, v. 83(2), p. 125-129, 2002.
- KOURKOUTAS, Y., "**Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review**", *Food Microbiology* 21.4, 377-397, 2004.
- KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. **Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems**, *Food Technology and Biotechnology*, 42:279–286, 2004.
- KWON, C. H.; SHIN, D.Y.; KANG, J.W., **Molecular Modeling and its Experimental Verification for the Catalytic Mechanism of *Candida Antarctica* Lipase B. J.** *Microbiol, biotechnol*, vol 17(7), 2007.
- LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, L.J.; CARRASCOSA, V.A. PESSELA, C.C.B.; GARCIA-OCHOA, **Studies on the activity and the stability of β -Galactosidases from *Thermus* sp. Strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis***, *Enzyme and Microbial Technology*, 30:392-405, 2002.
- LANGONE, M.A.; DE ABREU, M.E.; REZENDE, M.J.; SANT'ANNA, JR. G.L., **Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system**, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 100:987-996, 2002.
- LARIOS, A., **Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida Antarctica* lipase**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Washington, v. 65(4), p. 373-376, 2004.
- LAYER, P.; KELLER J.; LANKISCH P. G., **Pancreatic enzyme replacement therapy**, *Current Gastroenterology Reports*, New York, v. 3, p. 101-8, 2001.
- LAYER, P.; JUTTA, K., "**Lipase supplementation therapy: standards, alternatives, and perspectives**", *Pancreas* 26.1, 2003.
- LEE, D. X.; XIA, W. S.; ZHANG, J. L. **Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase**, *Food Chemistry*, London, v. 111, p. 291-295, 2008.
- LEJEUNE, K.E.; RUSSELL, A.J., **Covalent binding of a nerve agent hydrolyzing enzyme within polyurethane foams**, *Biotechnol. Bioeng.*, 450–457, 1996.
- LI, L. L.; DU, W.; LIU, D. H.; WANG, L. L. I., **Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium**, *J Mol Catal, B: Enzym* 43:58–62, 2007.

- LINGAPPA, K; PRAMOD, T. American Journal of Food Technology, **Imobilização de *Aspergillus niger* em espuma de poliuretano para produção de ácido cítrico da Alfarroba Pod Extrato**, 2011.
- LIU, K. J.; CHANG, H. M.; LIU, K. M., **Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through, interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase**, *Food Chemistry*, v. 100, p. 1303-1311. 2007.
- LOCK, L. L., **Lipolíticas Isoladas de Bromélias e Produção e Caracterização de Lipase Bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI8**, Microbiologia Agrícola e do Ambiente Seleção de Leveduras, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Programa De Pós-Graduação Em Química Industrial – UNISC, Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na, área de Microbiologia Industrial, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Fevereiro de 2007.
- LONGO J.ÚNIOR, L. S.; BOMBONATO, F. I.; FERRAZ, H. M. C., **Métodos de preparação de lactonas de anel médio**, *Química Nova*, São Paulo, v. 30, p. 415-424, 2007.
- LOZANO, P.; PÉREZ-MARÍN, A. B.; DE DIEGO, T.; GÓMEZ, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M. P.; RIOS, G. M.; IBORRA, J. L., **Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media**, *Journal of Membrane Science*, v. 201, p. 55-64, 2002.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C., **Caracterização de Polímeros**, Determinação de peso molecular e análise térmica, E-papers. Rio de Janeiro, 2001.
- LUE, B.M.; GUO, Z.; XU, X., **High-performance liquid chromatography analysis methods developed for quantifying enzymatic esterification of flavonoids in ionic liquids**, *J Chromatogr A*, 1198–1199 pp. 107–114, 2008.
- MACHADO, A. C. O., **Obtenção de Intermediários Quirais Utilizando Lipases em Reatores Assistidos por Membranas**, Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Rio de Janeiro , dezembro de 2011.
- MADALOZZO, A. D., **Síntese de Ésteres Etilícos utilizando uma Lipase Recombinante de *Rhizopus Oryzae***, Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como

requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2011.

- MAGNER, E., **Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials**, *Chem. Soc. Rev.*, Advance Article, Follow Journal, RSC Journals, 2013.
- MAGNUSSON, A.O., **Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida Antarctica* lipase B**, *ChemBioChem*, Weinheim, v. 6, p. 1051-1056, 2005.
- MALCATA, F.; XAVIER, "Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils—a review." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67.12, 890-910, 1990.
- MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a Polímeros**. 2. ed. revista e ampliada. São Paulo: Edgard Blücher, 191p, 1999.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F., **Possible methods for biodiesel production**, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, p. 1300-1311, 2007.
- MARÍA. P.D.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H.; SINISTERRA, J.V., **Lipase factor (LF) as a characterization parameter to explain the catalytic activity of crude lipases from *Candida rugosa*, free or immobilized in microemulsion-based organogels**, *Enzyme and Microbial Technology*, 35:277-283, 2005.
- MARIOTTI, P.M., **Hidrólise de lactose de soro de leite por meio de β –galactosidase imobilizada**, Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
- MARKOGLU, N.; WAINER, I. W., **Bioanalytical Separations**, New York, *Elsevier Science*, cap. 7. 2003.
- MARÓSTICA, J.M.R., **Biotransformação de terpenos para produção de compostos de aroma funcionais**, Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.
- MARTÍNEZ, M.; BRITO, B.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T., Characterization of a new internal promoter (P3) for *Rhizobium leguminosarum* hydrogenase accessory genes *hupGHIJ*, *Microbiology*, v. 150, n. 3, p. 665675, 2004.
- MARTINI, V. Q., **Resolução do (±)-Citronelol e Ácido (±)-Citronílico Via Esterificação Enantiosseletiva Catalisada pela Lipase de *Candida Antarctica***, Blumenau – SC, 2007.

- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J.A.V., **Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos**, *Química Nova*, v. 31(8), p. 1942-1947, 2008.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R., **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques**, *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.1451-1463, 2007.
- MCCABE, R. W.; TAYLOR, A., **Synthesis of novel polyurethane polyesters using the enzyme *Candida Antarctica* lipase B**, *Chemical Communications*, Cambridge, v. 7, p. 934-935, 2002.
- MELLOU, F.; LOUTRARI, H.; STAMATIS, H.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F.N., **Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells**, *Process Biochem*, 41 pp. 2029–2034, 2006.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F., **Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos**, *Química Nova*, v. 28(2), p. 296-305, 2005.
- MENDES, A. A., **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**, Tese de doutorado em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. de; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. J., *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, doi:10.1007/s10295-010-0880-9, 2010.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. de; OLIVEIRA, P. C. de, **Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial**, *Quim. Nova*, Vol. 34, No. 5, 831-840, Recebido em 14 de junho de 2010, aceito em 15 de dezembro de 10; publicado na web em 25 de março de 2011.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. de; GIORDANO, R. de L. C., **Triagem de Suportes Orgânicos e Protocolos de Ativação na Imobilização e Estabilização de Lipase de *Thermomyces lanuginosus***, *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 2, 245-251, Recebido em 1 de maio de 2012; aceito em 21 de agosto de 2012, publicado na web em 24 de janeiro de 2013.
- MENG, Q.; HU, J.; MONDAL, S.; J. MEMB., *Sci.*, 319, p.102, disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2008.03.032>, 2008.

- MEUNIER, S.M.; LEGGE, R. L., **Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol-gel immobilized lipase for transesterification.** *J Mol Catal B: Enzym* , 2010.
- MORENO-PIRAJÀN, J. C.; GIRALDO, L., **Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry,** Grupo de Investigación en Sólidos Porosos y Calorimetria, Universidad de los Andes, Bogotá, Colômbia, Volume 4, Issue 1 , páginas 55-62, *Arabian Journal of Chemistry*, janeiro de 2011.
- NARANJO, J. C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V. S.; MORENO-PIRAJÁNC, J. C., **Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel,** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Contents lists available at Science Direct, B: Enzymatic 66 166–171, 2010.
- NASCIMENTO, M. G.; ZANOTTO, S. P.; MELEGARI, S.P., **Estudos de proteção da célula de Saccharomyces Cerevisiae para utilização em reações de redução em meio Orgânico,** *Quim.Nova.v.25,n.4* p.567-571, 2002.
- NASSREDDINE, S.; KAROUT, A.; CHRIST, M.; PIERRE. A., **Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel en capsulated lipase,** *Applied Catalysis A: General* , 344, 70–77 , 2008.
- NELSON, D. L.; COX, M. M., **Lehninger - Princípios de Bioquímica,** 3ª ed, p. 189-224, Sarvier, 2002.
- NOBEL, P., org, The Official Web Site of the Nobel Prize, for The **Nobel Prize in Chemistry** 1946, <http://nobelprize.org>, 1946, Accessed 04 April 2007.
- OLIVEIRA, A.P., **“Asmáticos precisam ser tratados diariamente”**, Folha On Line, disponível em <http://www1.folha.uol.com.br>, visitado em julho de 2004.
- OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V., **Influence of compressed fluids treatment on the activity of Yarrowia lipolytica lipase,** *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*, n. 39, p.117–23, 2006.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A., **Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações,** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.3, p.97-109, ISSN:1980-0002, Artigo de Revisão, setembro-dezembro, 2012.

- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A., **Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações**, SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.7, n.3, p.97-109, ISSN:1980-0002, Artigo de Revisão, setembro-dezembro, 2012.
- OTTOSON, J., **Size as a parameter for solvent effects on Candida Antarctica lipase B enantioselectivity**, *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.1594, p. 325-334, 2002.
- PAHUJANI, S.; SHAMSHER S. K.; GHANSHYAM, G.; REENA G., **Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability**, *Bioresource Technology*, Received 10 December 2006; received in revised form 17 April 2007; accepted 20 April 2007, Available online 11 June 2007.
- PAIVA, A L.; BALCÃO,V. M.; MALCATA, F.X., "**Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases**", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, pp. 187-204, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. ; SOCCOL, V.T. ; SINGH, D. ; MOHAN, R. **Advances in Microbial Amylases**, *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 31, p. 135-152, 2006.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G.A., "**Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais**", *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A., **Histórico das Enzimas**, Workshop – As Enzimas Industriais na Produção de Alimentos, 2002, disponível em: <http://www.anbio.org.br/eventos/worksh52.htm>, visitado em 29 outubro de 2002.
- PAROUL, N., **Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico**, Tese de Doutorado. Universidade de Caxias do Sul - centro de ciências agrárias e biológicas instituto de biotecnologia e programa de pós-graduação em biotecnologia, 2011.
- PASSICOS, E., **Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized Candida Antarctica lipase under reduced pressure**, *Biotechnology Letters* , Dordrecht, v. 26(13), p. 1073-1076, 2004.
- PASTORE, M. G., **Uso de Enzimas nas Indústrias de Alimentos**, UNICAMP, disponível em http://www.anbio.org.br/palestras/palestra_glaucia.ppt, acesso em 30 outubro de 2010.
- PATACAS, R. C de, **Desenvolvimento, Caracterização e Otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de Nitrato baseado em**

microinterfaces gelificadas, Dissertação submetida para obtenção do grau de mestre em Química pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Junho de 2007.

- PATEL, P. M., **The BABAR detector**, Detectors for Asymmetric B-factories, Access Online Article, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, Volume 479, Issue 1, Pages 1-116 McGill University, Montréal, QC, Canada H3A 2T821 February 2002.
- PATIL, N.K.; VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M.H.; NAYAK, S.A.; KAREGOUDAR, T.B., **Enhanced and potential degradation of *o*-phthalate by *Bacillus* sp. immobilized cells in alginate and polyurethane**, Int. Biodeter. Biodegr. 57, 82–87, 2006.
- PAULA, A.V.; MOREIRA, A.B.R.; BRAGA, L.P.; CASTRO, H.F.; BRUNO, L.M., **Comparação do desempenho da lipase de *Cândida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias**, Química Nova, v. 31(1), p. 35-40, 2008.
- PAULICHEI, I.; FERREIRA, R. S.; KLOSS, J.R., **Preparação e Caracterização de Espuma de Poliuretano para Suporte de Lâmpadas Fluorescentes**, Sociedade Educacional de Santa Catarina - Faculdade de Tecnologia Tupy, Curitiba-PR, 2010.
- PEREIRA, E.B., Cinética Enzimática, **Enzimas e suas Aplicações**, Engenharia Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis, Junho 2001.
- PEREIRA, P. S.; HEIZIR, F. de C.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. de, **Imobilização de Enzimas e sua Estabilização**, Enzimas Cap 06 - Sa *pt.scribd.co*, publicado em 24 de setembro de 2010.
- PINHEIRO, A. D. T.; BRÍGIDA, A. I. S.; GONÇALVES, L. R. B., **Influência do pH no Processo de Imobilização de Lipase em Fibra da Casca de Coco Verde**, VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 1 de maio de 2011.
- PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B., **Biodiesel: Na overview**, *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 16(6B), p. 1313-1330, 2005.

- PIRES-CABRAL, P.; DUBREUCQ, E.; FONSECA, M.M.R. DA; FERREIRA-DIAS, S., **Partitioning of water in organic systems with lipase immobilized in polyurethane foams**, *Biochemical Engineering Journal* 26 (2005) 29–37, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal, Received 19 December 2004; received in revised form 4 June 2005; accepted 6 June 2007.
- PRABAHARAN, M. J., *Biomater. Appl.* 23, 5, 2006.
- QIAN, Z. & LUTZ, S. **Improving the catalytic activity of *Candida Antarctica* lipase B by circular permutation**, *Journal of the American Chemical Society*, v.127, p. 13466-13467, 2005.
- QUEIROZ, N., **Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisadas por lipases**, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- QUEZADA, M.A., CARBALLEIRA, J.D., SINISTERRA, J.V., ***Monascus kaoliang* CBS 302.78 immobilized in polyurethane foam using *iso*-propanol as co-substrate: optimized immobilization conditions of a fungus as biocatalyst for the reduction of ketones**, *Bioresour. Technol.* 100, 2018–2025, 2009.
- RANGEL, X. S.; GARCÍA, J.; ORREGO, C. E., **Immobilization of Lipase From *Candida Antarctica* on Chitosan-Gelatin Supports**, *Rev. Colomb. Quim.* vol. 40 n° 2, Bogotá May/Aug.2011.
- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. R.; MILLER, R., **Colloids, polymers and surfactants. Special Issue in honour of Brian Vincent**, Lipases at interfaces: A review, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2008.06.001>, How to Cite or Link Using DOI, Permissions & Reprints, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volumes 147–148, Pages 237–250, March–June, 2009.
- REJEB, I. B.; ARDUINI, F.; AMINE, A.; GARGOURI, M.; PALLESCHI, G. **Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination**, *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 594, p. 1-8, 2007.
- RESEARCH, M. F., **Enzymes in Industrial Applications**, Global Markets, <http://www.bccresearch.com/report/BIO030F.html>, 2011, accessed 30 visited am 2013.
- RIBEIRO, B. D., **Aplicação de Tecnologia Enzimática na Obtenção de β -Caroteno a partir de Óleo de Buriti**, Dissertação de Mestrado Apresentada ao Corpo

- Docente do Curso De Pós-Graduação em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos Da Escola, Rio de Janeiro, Fevereiro de 2008.
- RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 51, 100, 2008.
- ROSEVEAR. A.; KENNEDY. J. F.; CHABRAL. J. M. S., **Imobilizadas Enzimas e Células: Adam Hilger, Bristol**, 1987, *Jornal de Tecnologia Química e Biotecnologia*, Volume 44, Issue 2, página 164, 1989.
- ROTTICCI, D.; NORIN, T.; HULT, K.; MARTINELLE, M., **An active-site titration method for lipases**, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1483, p. 132-140, 2000.
- SAID, S.; PIETRO, R .C.L.R., **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Cap. 1, p. 1 – 7, Ed. Legis Summa, 2004.
- SALAH, R. B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y.; J., **Biosci. Bioeng.**, 103 , 368, 2007.
- SAMUKAWA, T.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; FUKUDA, H., **Pretreatment of immobilized Candida Antarctica lipase for biodiesel fuel production from plant oil**, *Journal Bioscience Bioengineering*, v.90, p.180-183, 2000.
- SÁNCHEZ-ADSUAR, M. S., **Influence of the composition on the crystallinity and adhesion properties of thermoplastic polyurethane elastomers**, *Internacional Journal Adhesion & Adhesives*, v. 20, p. 291-298, 2011.
- SANTOS, R. D., **Produção Enzimática de Poli(ε-Caprolactona) em Dióxido de Carbono Supercrítico**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2011.
- SARROUH, B.; SANTOS, T.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V., “Up-to-, **Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market**”, *Bioprocessing & Biotechniques*, S:4, pp. 1-10 2012.
- SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADDOO, S.; GULATI, R., **Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry**, 2003.
- SENANAYAKE, S. P. J. N.; SHAHIDI, F., **Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil via lipase-catalyzed transesterification**, *Food Chemistry*, London, v. 85, p. 489-496, 2004.

- SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C. A.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A., *Microb. Technol*, 48, 61, 2011.
- SHANLEY, A., “**Enzymes Usher in a New Era**”, *Chem. Eng.*v. 105, n. 7, pp. 63-65, 1998.
- SHARMA, R.; CHISTY, Y.; BANERJEE, U. C., **Production purification, characterization and application of lipases**, *Biotechnology Advances*, v. 19, p.627-662, 2001.
- SHELDON, R. A., **Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance**, *Adv. Synth. Catal.* v. 349, p. 1289-1307, 2007.
- SHIM, S. S.; KAWAMOTO, K., **Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor**, *Water Research*, New York, v. 36, n. 18, p. 4445-4454, 2002.
- SHIMADA, Y. **Regiospecific analysis by ethanolysis of oil with immobilized *Candida Antarctica* lipase**, *Lipids*, Champaign, v.38, p. 1281-1286, 2007.
- SIDDIQUI, K.S.; CAVICCHIOLI, R., **Improved thermal stability and activity in the cold-adapted lipase B from *Candida Antarctica* following chemical modification with oxidized polysaccharides**, *Extremophiles*, Japan, v.9, p. 471-476, 2005.
- SILVA, A. J.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M., **Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea**, *Anaerobe*, London, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2006.
- SILVA, J. A. da, **Preparation of biocatalysts using *Candida antarctica* lipase type B immobilized for synthesis of esters of vitamin A**, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2007.
- SILVA, V.C.F.; CONTESINI, F.J.; CARVALHO, P.O., **Enantioselective behavior of lipases from *Aspergillus niger* immobilized in different supports**, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 36, p. 949–954, 2009.
- SILVA (a), M. F.; RIGO, D.; MOSSIA, V.; DALLAGOA, R. M.; HENRICKA, P.; KUHNA, G. O.de; ROSA, D. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H., **Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam**, FBP-331; No. of

Pages 6, Contents lists available at *SciVerse Science Direct*, Food and Bioproducts Processing, 2012.

- SILVA (b), M. A. da, **Caracterização de Nanocompósitos de Poliuretano/Montmorilonita Organofílica por RMN de Baixo Campo**, Laboratório de Nanocompósitos Poliméricos, UFRJ, Laboratório de Nanocompósitos Poliméricos, UFRJ Polímeros, vol. 22, n. 5, p. 481-485, 2012.
- SIRKO A.; BRODZIK R., 2000, **Plant ureases: roles and regulation**, *Acta Biochim Polonic*, Traduzido por ARTUR MELO, Investigando a Acção da Urease, Published in *Science in Scholl*, disponível em <http://www.scienceinschool.org>, 2008, visualizado em 3 de março de 2013.
- SONG, C.; LIU, G.; XU, J., **Zhen-Ming Chi**Corresponding author contact information, *Process Biochemistry*, Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica, Volume 45, Issue 6, China, Pages 954–960, June 2010.
- STEVENS, M. P., **Polymer Chemistry**: An introduction, Oxford University Press, New York, 1999.
- SUEN, W.C., **Improved activity and thermostability of *Candida Antarctica lipase B* by DNA family shuffling**, Protein Engineering Design and Selection, Oxford, v. 17, p. 133-140, 2004.
- SUSLA, M.; NOVOTNY, C.; SVOBODOVÁ, K., **The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures**, *Bioresource Technol*, 98 2109–2115, 2007.
- SVENDSEN, A.; SKJOET, M.; YAVER, D.; CHRISTENSEN, L. L. H.; LARSEN, S. E.; LUNDIN, N.; LAMSA M; GREGORY P. C., **New lipase, useful for manufacturing a pharmaceutical composition for treating digestive disorders, pancreatic exocrine insufficiency, pancreatitis, cystic fibrosis, or diabetes type I or II**, Patent Number(s): WO2008079685-A2, 2008.
- SZYMANSKA, K.; BRYJAK, J.; MROWIEC-BIALON, J.; JARZEBSKI, A. B., **Application and Properties of Siliceous Mesostructured Cellular Foams as Enzymes Carriers to Obtain Efficient Biocatalysts**, *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 99, p. 167-175, 2007.
- TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H., **Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A**

comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst, *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 39, p. 185-189, 2008.

THURECHT, K. J.; HEISE, A.; DEGEUS, M.; VILLARROYA, S.; ZHOU, J.; WYATT, M. F.; HOWDLE, S. M., **Kinetics of Enzymatic Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide**, *Macromolecules*, n.39, p.7967-7972, 2006.

TIANWEI, A.; JIKE, L. A. B.; KAILI NIE, A.; DENG, A.; FANG, W. A., **Biodiesel production with immobilized lipase: A review**, University of Chemical Technology, Beijing, China, *Biotechnology Advances*, Elsevier Inc. All rights reserved, Contents lists available at Science Direct, *Biotechnology Advances*, Available online 24 May 2010.

TIGGEMANN, L.C.; ORLANDO, T.; CHIARADIA, V.; PIAZZA, S.; PUTON, B. M. S.; CANSIAN, R. L.; EMMERICH, D. J.; PAROUL, N.; OLIVEIRA, D. de, **Estudo cinético de produção de geranyl oleato: efeito da razão molar, concentração de enzima e temperatura**, XIX Encontro de Química da Região Sul Tubarão, Sociedade Brasileira de Química (SBQ) Secretarias Regionais SC, PR e RS, 2012.

TINCOM, T. T. S., **“Otimização de parâmetros para a obtenção de ácido mandélico a partir de mandelato de etila utilizando lipases”**, Dissertação de mestrado em Farmacêutica- Universidade Federal do Rio de Janeiro, pp. 85, 2003.

TISCHER, (a) W.; KASCHE, V., **Immobilized enzymes: crystal or carriers? Trends in Biotechnology**, v.17, p.326-335, 1999.

TISCHER, (b) W.; WEDEKIND, F., **Immobilized Enzymes: Method and Applications Topics in Current Bio-chemistry In :Biocatalysis – from Discovery to application**, ISSN 0340-1022 (Print), 1436-5049 (Online), 2000 : 95-126, 1999.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F., **Immobilized Enzymes: Method and Applications Topics in Current Bio-chemistry In :Biocatalysis – from Discovery to application**, ISSN 0340-1022 (Print), 1436-5049 (Online), 2000 : 95-126, 1999.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V., **A review on microbial lipases production**, *Food and Bioprocess Technology*, 3:182-196, 2010.

- UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T., **Alwyn.Crystilization and preliminary X-ray studies of lipase B from Candida Antarctica**, *Journal of Molecular Biology*, vol. 235, no. 2, p. 790-792, January 1994.
- VENTURA, S. P. M.; SOUSA, S. G.; FREIRE, M. G.; SERAFIM, L.S.; LIMA, A. S.; COUTINHO J. A.P., **Design of ionic liquids for lipase purification Cover image**, Volume 879, Issue 26, Pages 2679–2687, Aracaju-SE, Brazil, *Journal of Chromatography B*, 15 September 2011.
- VIEIRA, C. D., **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. p. 4, 8, 25, 2009.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J., “**Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches**”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VILLENEUVE, P., **Lipases in lipophilization reactions**, *Biotechnol Adv*, 25, pp. 515–536, 2007.
- VILMAR, W.D., **Química e tecnologia dos poliuretanos**, Rio de Janeiro, disponível em <http://www.poliuretanos.com.br>, acesso em 28 de fevereiro de 2013.
- VITOLO, M., **Aspectos da Técnica de Imobilização**, Universidade de São Paulo, 2005.
- VOET, D.; VOET, J.G., **Biochemistry**, 3 ed. Wiley, United States of America, p .1591, 2006.
- VULFSON, E. N., **Industrial applications of lipases. In: Lipases; Structure, Biochemistry Applications**, (P. Wooley, ed) Cambridge University Press, 271–288, 1994.
- WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, J de C., **Revisão Aspectos da Produção Industrial de Enzimas**, Revista Citino, Vol. 1, No. 1, 30-36, 2011.
- WINKLER, F. K.; GUBERNATOR. K., **Lipases - their structure, biochemistry and application**, Cambridge University Press: Cambridge, 1994.
- WOODS, G., **Flexible polyurethane foams**, London: *Applied Science Publishers*, 352 p, 1995.
- WOOLEY, P.; PETERSEN, S.B., **Lipases: their structure, biochemistry and application**, Cambridge University, Cambridge, 1994.

- YEE, L.; AKOH, C.C.; PHILLIPS, R.S., **Lipase PS-catalized transesterification of citronellyl butyrate and geranyl capronate: effect of reaction parameters**, *JAACS*, 74(3):255-260, 1997.
- YEGANEH, H.; LAKOURAJ, M.M.; JAMSHID I, S., **Synthesis and properties of biodegradable elastomeric epoxy modified polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol)**, *European Polymer Journal*, v.41, p. 2370- 2379, 2005.
- YUE, B; YANG, J.; WANG, Y.; HUANG, C.; DAVE, R.; PFEFFER, R., **Particle encapsulation with polymers via in situ polymerization in supercritical CO₂**, *Powder Technology*, v.146, p.32-45, 2004.
- ZAIAT, M., **Desenvolvimento de Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) para Tratamento de Águas Residuárias**, São Carlos. 157p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1996.
- ZANIN, G. M., **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada**, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1987.
- ZANIN, (a) G. M.; MORAES, F. F., **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**, Ribeirão Preto, Ed. Legis Summa, cap. 4, p. 35-85, 2004.
- ZANIN, (b) G. M., **Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity**, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 29, p. 69-79, 2004.
- ZAREVÚCKA, M.; ZALSKA, Z.; REJZEK, M.; STREINZ, L.; WIMMER, Z.; MACKOVA, M.; DEMNEROVA, K., **Lipase-mediated hydrolysis and esterification**, 1996.
- ZAWADZKI, S. F., **Síntese e Caracterização de Redes Poliméricas Interpenetrantes de Poliuretano e Poli(metacrilato de metila)**, Rio de Janeiro, 1996.
- ZHANG, D.-H.; BAI, S.; SUN, Y., **Lipase-catalyzed regioselective synthesis of monoester of pyridoxine (vitamin B₆) in acetonitrile**, *Food Chem*, 102 pp. 1012–1019, 2007.