

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES URI – ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO
POLI-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO (PHBV) E
POLIURETANO (PU) COMO SUPORTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI – Erechim como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Ilizandra Aparecida Fernandes

Orientadores: Prof. Débora de Oliveira
Prof. Elisandra Rigo
Prof. José Vladimir de Oliveira

Erechim-RS
Maio de 2013.

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO
POLI-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO (PHBV) E POLIURETANO
(PU) COMO SUPORTES**

ILIZANDRA APARECIDA FERNANDES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof^a. Débora de Oliveira
Orientadora

Prof. José Vladimir de Oliveira
Orientador

Prof^a. Elisandra Rigo
Orientadora

Prof^a. Helen Treichel

Prof. Wagner Luiz Priamo

Prof^a. Natalia Paroul

Prof. Rogério Marcos Dallago

Erechim, maio de 2013.

Ao meu esposo Luciano
e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente e superar todos os obstáculos que surgiram ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la dignamente, protegendo-me, incentivando-me e me apoiando, ofereço o mérito de mais esta conquista.

Às minhas irmãs, Fernanda e Franciele, pelas horas alegres, carinho e atenção.

Ao meu esposo, pela paciência, companheirismo e apoio nas horas difíceis.

Aos meus orientadores, Débora de Oliveira, Elisandra Rigo e José Vladimir de Oliveira, pela dedicação, amizade, confiança e conhecimento.

À banca examinadora, pela disponibilidade, interesse e valiosas contribuições.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, pela receptividade e primorosa atenção conferidas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI- Erechim.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Termodinâmica Aplicada, Laboratório de Biotecnologia e da Central de Materiais.

Gostaria de agradecer à Universidade pela estrutura que sempre esteve a minha disposição.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Aprender e nunca estar satisfeito é sabedoria;
ensinar e nunca se cansar é amor.

Jo Petty

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

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO POLI-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO (PHBV) E POLIURETANO (PU) COMO SUPORTES

Ilizandra Aparecida Fernandes

05/2013

Orientadores: Débora de Oliveira

Elisandra Rigo

José Vladimir de Oliveira

O presente trabalho teve por finalidade avaliar a imobilização das lipases de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) (Amano PS) e de *Candida antarctica* B (CalB), em nanopartículas do polímero poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) e em poliuretano (PU). Com a lipase Amano PS foram verificadas as condições de processo de imobilização à alta pressão com fluido supercrítico (CO₂), considerando que esta se apresentou parcialmente solúvel em diclorometano. Considerando os resultados obtidos com a lipase Amano PS, para a lipase CalB foi avaliada a imobilização em nanopartículas de PHBV em sistema à baixa pressão variando-se o tempo (30 a 150 min) e o pH (5 a 10), além da sua imobilização em estrutura de poliuretano (PU). Nestes casos verificou-se a estabilidade do derivado enzimático frente a altas temperaturas (40, 60 e 80 °C) e a baixa temperatura (4 °C), bem como a capacidade de reciclo reacional de ambos os imobilizados. Este estudo foi ainda complementado pela avaliação da possibilidade de aplicação da lipase CalB imobilizada como catalisador de reações de esterificação. Os resultados

indicaram baixo rendimento da imobilização da lipase Amano PS em sistema à alta pressão com PHBV avaliado em reação de hidrólise, resultado este que motivou o estudo da imobilização à baixa pressão com a lipase CalB líquida em reação de esterificação. Neste caso, o sistema de imobilização da CalB à baixa pressão com PHBV durante 120 min em pH 7 indicou promissor rendimento do processo, além deste imobilizado após 21 horas à temperatura de 60 °C apresentar uma atividade residual de 67% em relação à atividade inicial e durante a sua estocagem a 4°C por 30 dias verificou-se uma atividade residual de 50%. Concomitante a estes resultados obteve-se os da CalB imobilizada em PU. O derivado enzimático obtido apresentou-se 100% estável após 21 horas de exposição nas mesmas temperaturas e a baixa temperatura (4 °C) por 30 dias manteve 100% de sua atividade inicial tanto na forma fracionada como triturada. A avaliação do reciclo reacional indicou a possibilidade de uso em 4 ciclos consecutivos para a catálise da reação de síntese do etil oleato, tanto para a enzima imobilizada em PHBV quanto em PU. A aplicação do imobilizado nas reações de produção de geranyl oleato apresentaram 88% e 87,68% de rendimento para PHBV e PU, respectivamente. Para a síntese de oleato de etila a CalB imobilizada em PHBV e PU apresentou 17,43% e 19,34 % de rendimento, mas para ambas as enzimas imobilizadas a reação utilizando geraniol e ácido propiônico não conduziu à produção do produto de interesse. As nanopartículas de PHBV, poliuretano e a enzima CalB imobilizada em PHBV e PU foram previamente caracterizadas pela obtenção de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratogramas de raios X (DRX), os quais apresentaram características dos polímeros PHBV (cristalino) e PU (amorfo).

Palavras-chave: imobilização, lipases, nanopartículas, PHBV, poliuretano.

Abstract of thesis presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor in Food Engineering.

IMMOBILIZATION OF LIPASES USING POLY-HYDROXYBUTYRATE-CO-HYDROXYVALERATE (PHBV) AND POLYURETHANE (PU) AS SUPPORTS

Ilizandra Aparecida Fernandes

05/2013

Advisors: Débora de Oliveira

Elisandra Rigo

José Vladimir de Oliveira

This study aimed to evaluate the immobilization of lipase PS Amano and *Candida antarctica* B on two supports, nanoparticles of poly-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) and polyurethane (PU). For lipase PS Amano immobilization in PHBV it was evaluated the enzyme concentration in a high pressure system. Immobilization of lipase CalB at low pressure in PHBV was carried out assessing the effects of time (30-150 min) and pH (5 to 10) on the immobilization process. Immobilization tests were also conducted in polyurethane and subsequent immobilization of CalB in this support. The stability of the enzymatic product was evaluated at temperatures of 40, 60, and 80 °C and the ability to recycle and stability to storage (4 °C) were evaluated for both supports. A study on the application of the lipase CalB derivative as a catalyst in esterification reactions was performed. The immobilized lipase PS amano in PHBV resulted in low yields. Results regarding CalB / PHBV immobilization indicated times up to 120 min and optimum pH 7 to improve immobilization of this lipase using PHBV as support. The exposure of enzyme CalB / PHBV temperature at 60 °C for 21 h led to a decrease of only 67% of residual activity. The derived enzyme retained 50% of its initial activity during storage for 30

days at 4 °C. The influence of high temperature on immobilized CalB in PU after 21 hours of exposure retained 100% of its activity. The assessment of reuse has afforded good stability of the immobilized enzyme for 4 consecutive cycles for both brackets. The application of immobilized enzyme to the production of geraniol oleate showed 88% and 87.68% yields for PHBV and PU, respectively. For the synthesis of ethyl oleate immobilized CalB on PU and PHBV showed 17.43% and 19.34% yields, but for both immobilized enzymes the reaction with geraniol propionate showed no conversion. Nanoparticles of PHBV, PU foams and enzyme immobilized CalB in PHBV and PU were previously characterized by scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD).

Keywords: nanoparticles, immobilization, PHBV, polyurethane, lipase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Enzimas	7
2.1.1 Lipases.....	7
2.1.1.1 Lipase Amano PS	8
2.1.1.2 Lipase de Candida antarctica B (CalB)	9
2.1.2 Aplicações industriais de lipases	9
2.2 Estabilidade das lipases.....	12
2.3 Métodos para Imobilização de Enzimas	13
2.3.1 Encapsulamento.....	13
2.3.1.1 Matriz	13
2.3.1.2 Membranas	14
2.3.2 Ligação	15
2.3.2.1 Adsorção	15
2.3.2.2 Ligações covalentes.....	16
2.4 Suportes para imobilização de enzimas	17
2.4.1 Poli (hidroxibutirato-co- hidroxivalerato).....	17
2.4.2 Processos de formação de micro e nanopartículas empregando fluidos pressurizados	20
2.4.2.1 Fluidos supercríticos como solventes: (RESS, SSI)	21
2.4.2.2 Fluidos supercríticos como soluto: Partículas de Soluções Saturadas em Gás (PGSS)	22
2.4.2.3 Fluidos supercríticos como antissolventes: (GAS/SAS/PCA/ASES/ SEDS/SFEE).....	23
2.4.2 Espumas de poliuretano	24
2.5 Enzimas Imobilizadas	26
2.5.1 Imobilização em sistema à alta pressão	26
2.5.2 Imobilização em sistema à baixa pressão	28
2.6 Considerações a respeito do estado da arte	29

3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Materiais	31
3.1.1 Equipamentos	31
3.1.2 Reagentes	32
3.1.2.1 Enzimas	33
3.1.2.2 Suportes	33
3.2 Métodos	35
3.2.1 Avaliação da solubilidade das enzimas e PHBV em solventes	35
3.2.2 Imobilização a alta pressão	35
3.2.2.1 Aparato experimental utilizado para co-precipitação do lipase Amano PS no polímero PHBV	35
3.2.2.2 Procedimento experimental da co-precipitação da lipase Amano PS com polímero PHBV	43
3.2.3 Imobilização a baixa pressão	49
3.2.3.1 Imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte	49
Precipitação do polímero PHBV para formação de nanopartículas	49
Processo de imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte	50
3.2.3.2 Imobilização da lipase CalB utilizando poliuretano como suporte	51
Polimerização dos monômeros	51
Imobilização da lipase CalB	52
Descrição da Técnica de Amostragem da Enzima Imobilizada	53
3.2.4 Avaliação da estabilidade da CalB imobilizada em sistema a baixa pressão	54
3.2.4.1 Estabilidade da enzima imobilizada à altas temperaturas	54
3.2.4.2 Estabilidade da enzima imobilizada à baixas temperaturas	55
3.2.5 Avaliação da capacidade de ciclos operacionais da CalB imobilizada ..	55
3.2.5.1 CalB imobilizada em PHBV	55
3.2.5.2 CalB imobilizada em PU	56
3.2.6 Métodos de determinação de atividade enzimática	56
3.2.6.1 Determinação da atividade hidrolítica – Método titulométrico	56
3.2.6.2 Determinação da atividade hidrolítica - Método espectrofotométrico ..	57
3.2.6.3 Determinação da atividade de esterificação	58

3.2.7	Determinação do teor de proteína	59
3.2.8	Cálculo dos parâmetros de imobilização	60
3.2.9	Caracterização estrutural do polímero e enzima imobilizada	61
3.2.9.1	Isotermas de Adsorção em Nitrogênio (BET)	61
3.2.9.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
3.2.9.3	Difração de Raio-X	61
3.2.10	Avaliação da aplicação de lipases na catálise de reações de interesse .	62
3.2.10.1	Esterificação enzimática de geraniol e ácido oléico	62
3.2.10.2	Esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico	62
3.2.10.3	Esterificação Enzimática de ácido oléico e etanol	63
3.2.10.4	Determinação do rendimento das reações de síntese	63
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Avaliação da solubilidade das lipases	64
4.2	Avaliação da imobilização a alta pressão	65
4.2.1	Imobilização lipase Amano em PHBV	65
4.3	Avaliação da imobilização a baixa pressão	70
4.3.1	Imobilização da CalB em PHBV	70
4.3.2	Imobilização da CalB em PU	74
4.3.2.1	Reação de polimerização: síntese do poliuretano (PU)	74
4.3.2.2	Avaliação da conformação do imobilizado com lipase CalB solúvel ...	75
4.3.3	Estabilidade térmica da CalB livre e imobilizada a altas temperaturas	77
4.3.3.1	Lipase CalB imobilizada em PHBV	77
4.3.3.2	Lipase CalB imobilizada em PU	80
4.3.3.3	Resumo da estabilidade térmica da lipase CalB livre e imobilizada em diferentes suportes	81
4.3.4	Estabilidade térmica da CalB livre e imobilizada à baixa temperatura e temperatura ambiente	83
4.3.4.1	Lipase CalB imobilizada em PHBV	83
4.3.4.2	Lipase CalB imobilizada em PU	84
4.3.5	Avaliação da capacidade de reciclo da CalB imobilizada	86
4.4	Caracterização dos suportes e da CalB imobilizada	87
4.4.1	Análise de BET	87

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura do PHBV	87
4.4.3 Análise de DRX	88
4.4.3.1 PHBV	88
4.4.3.2 Poliuretano	89
4.5 Avaliação da aplicação da lipase CalB imobilizada na catálise de reações de síntese	91
5. CONCLUSÕES	93
5.1 Sugestões para trabalhos futuros	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXO A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO <i>p</i> -NITROFENOL (pNP)	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Métodos de imobilização de enzimas (Dalla Vecchia et al., 2004).	13
Figura 2 - Fórmula estrutural plana do poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (Tao et al., 2009).	18
Figura 3 - Esquema representativo das etapas para formação da espuma de PU (Vilar, 2013).	25
Figura 4 – Aspecto do polímero PHBV bruto (a) e purificado (b).	34
Figura 5 – Apresentação dos monômeros usados na elaboração da espuma de PU, (a) polioliol e (b) isocianato.	34
Figura 6 -Diagrama esquemático do aparato experimental de precipitação e co-precipitação.....	36
Figura 7 - Tubos capilares conectados aos <i>PEEK Tubing</i>	39
Figura 8 - Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade experimental utilizada na co-precipitação da lipase Amano PS em PHBV.....	40
Figura 9 - Filtro membrana de politetrafluoretileno.	41
Figura 10 - Vista detalhada da unidade experimental de utilizada na co-precipitação da lipase Amano PS em PHBV.	42
Figura 11 - Agitador rotatório empregado na imobilização de enzimas utilizando PHBV como suporte.	50
Figura 12 - Apresentação esquemática do procedimento de imobilização da lipase CalB em PU.	53
Figura 13 - Demonstração da metodologia de amostragem da espuma de PU formada com lipase CalB, considerando em (a) divisão em duas parcelas (1 e 2) na vertical vista superior do polímero e (b) divisão em três parcelas (A, B e C) na horizontal vista lateral.....	54
Figura 14 – Aparato experimental utilizado para avaliação do reciclo reacional da CalB imobilizada em PHBV.....	56
Figura 15 - Fotos da câmara de precipitação referentes as nanoparticulas formadas durante os experimentos de imobilização (a, b e c).....	66
Figura 16 - Aspecto do PHBV precipitado com CO ₂ em sistema à alta pressão.	70

Figura 17 - Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros polioliol e isocianato, respectivamente, sendo (a) 5 e 2 mL, (b) 5 e 3 mL, (c) 5 e 4 mL (d) 5 e 5 mL e (e) 3 e 5 mL.....	74
Figura 18- Vista frontal da amostra de espuma de poliuretano inteira (a) e vista frontal da espuma de poliuretano cortada ao meio (b).	76
Figura 19- Aspecto da CalB imobilizada em PHBV, triturada.	77
Figura 20 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB livre como função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80° C).	78
Figura 21 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PHBV em função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80° C).	79
Figura 22- Avaliação da estabilidade da lipase CalB livre como função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).	80
Figura 23- Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PU como função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).	81
Figura 24 – Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PHBV em função do tempo de estocagem a 4 °C.	83
Figura 25 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PU em função da temperatura ambiente.....	84
Figura 26 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PU em função da temperatura de 4 °C.....	85
Figura 27 - Estabilidade operacional da reação de esterificação do ácido oléico para CalB imobilizada em poliuretano.	86
Figura 28 - Micrografias de nanopartículas de PHBV (a); nanopartículas de PHBV com enzima CalB (b).	87
Figura 29 - Difractogramas de raios X das amostras de PHBV precipitado.	88
Figura 30 - Difractogramas de raios X das amostras de CalB imobilizada em PHBV.	89
Figura 31 - Difractogramas de raios X das amostras de PU puro.	90
Figura 32 - Difractogramas de raios X das amostras de CalB imobilizada em PU.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações industriais de lipases.....	11
Tabela 2 – Condições experimentais da concentração de lipase Amano PS e do polímero PHBV avaliados no processo de imobilização em sistema à alta pressão.....	43
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental 2 ² com os valores codificados e reais da concentração do polímero PHBV e da pressão no processo de imobilização em sistema à alta pressão.	44
Tabela 4 - Descrição das concentrações dos monômeros avaliadas para formação da espuma de PU.	51
Tabela 5- Atividades hidrolíticas obtidas nas condições experimentais para imobilização da lipase Amano PS em PHBV à alta pressão.	65
Tabela 6 – Avaliação da influência da concentração de polímero PHBV e pressão na análise da atividade da lipase Amano PS através da realização do planejamento experimental completo 2 ²	68
Tabela 7 - Resultados obtidos na imobilização da CalB em PHBV em sistema à baixa pressão considerando diferentes tempos de contatos da solução enzimática com o suporte avaliado pela atividade de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil butirato da enzima livre e imobilizada em cada condição experimental.	71
Tabela 8 - Resultados obtidos na imobilização da CalB em PHBV em sistema à baixa pressão considerando diferentes pHs de contatos da solução enzimática com o suporte avaliado pela atividade de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil butirato da enzima livre e imobilizada em cada condição experimental.	73
Tabela 9- Estabilidade da CalB livre e imobilizada após 21 horas de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).....	82
Tabela 10 - Conversões reacionais obtidas nas reações catalisadas pela CalB imobilizada em PHBV e PU na esterificação de geraniol com ácido oléico e propiônico e do ácido oléico e etanol.	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASES - Sistema de Extração de Solvente em Aerossol
BET - Isotermas de Adsorção de Nitrogênio
CALB - Lipase de *Candida antarctica* fração B
CO₂ - Dióxido de Carbono
DAG - Diacilgliceróis
DCM - Diclorometano
DMSO - Dimetilsulfóxido
DRX - Difração de Raio-X
ESD - Espectroscopia por Dispersão de Energia
FSC - Fluido Supercrítico
GAS - Gás Antissolvente
I-PLA - Poli(l- lactídeo)
MAG - Monoacilgliceróis
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
NaOH - Hidróxido de Sódio
N₂ - Nitrogênio líquido
P - Pressão
PCA - Precipitação com Antissolvente Comprimido
PGLA - Poli(DL- lactídeo -co- glicolídeo)
PGSS - Partículas a Partir de Soluções Saturadas de Gás
PHA - Polihidroxialcanoatos
PHBV - Poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxivalerato)
pNFP - *p*-nitrofenil butirato
pNP - *p*-nitrofenol
PP - Polipropileno
PS - *Pseudomonas cepacia*
PU - Poliuretano
RESS - Rápida Expansão de Soluções Supercríticas
SAS - Antissolvente Supercrítico
SCFE - Extração de Emulsões com Fluidos Supercríticos

SEDS - Dispersão de Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos

SSI - Impregnação de Solventes Supercríticos

T - Temperatura

1. INTRODUÇÃO

As enzimas consistem em uma classe especial de proteínas em que a atividade biológica surge a partir de um sítio ativo, unido pela configuração tridimensional da molécula, onde pequenas mudanças neste sítio podem alterar a funcionalidade da enzima, considerando que a desnaturação destas proteínas está diretamente associada à mudanças conformacionais de sua estrutura protéica (Hendrickx et al., 1998; Mateo et al., 2007).

Assim, apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação industrial não é tão imediata porque, apesar das possíveis vantagens, as enzimas apresentam outras características que limitam a sua utilização em escala industrial. Dentre estas destacam-se a solubilidade das enzimas no meio de reação, o que inviabiliza economicamente sua separação dos produtos, a utilização destas como matéria-prima não reciclável, gerando elevação do custo operacional do sistema e a instabilidade operacional, restringindo a aplicação deste biocatalisador (Burton et al., 2002; Lorenz e Eck, 2005).

Neste contexto, a imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, considerando que ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens dos biocatalisadores acaba sendo eliminada e as enzimas podem ser utilizadas em processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos (Zanin e Moraes, 2004; Rodrigues et al., 2008).

As razões para a escolha de um derivado imobilizado podem variar dependendo da aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; em alguns casos, a ocorrência de modificações favoráveis das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros (Mendes et al., 2011; Da Rós et al., 2010), para isso são utilizados suportes sólidos os quais permitem estas novas características para os biocatalisadores (Milašinovic et al., 2010).

Para que o emprego de enzimas imobilizadas torne-se um processo economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte empregado assim como o método de imobilização. Entre os métodos de imobilização de enzimas disponíveis na literatura destacam-se a adsorção em materiais insolúveis, a copolimerização empregando um monômero reativo, o encapsulamento em gel ou ligação covalente em suporte insolúvel (Stark e Holmberg, 1989; Yasin et al., 2011).

Assim, diferentes suportes têm sido empregados para imobilização de várias enzimas, destacando-se atualmente os processos de microencapsulação, os quais podem ser empregados em diferentes áreas da indústria, em especial na formação de microcápsulas ou revestimentos, com objetivo de isolar compostos instáveis, para evitar a decomposição de um componente lábil, em sistemas específicos e/ou de liberação controlada (Garay et al., 2010). Em bioprocessos, os fluidos supercríticos (FSC) podem também ser usados para formação de partículas utilizando a técnica de Dispersão da Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (SEDS) (Cocero et al., 2009; Jung e Perrut, 2001), também como antissolvente líquido, apresentando como principal vantagem a completa remoção do antissolvente pela redução da pressão para a fase gás (Reverchon, 1999).

Neste contexto, vários polímeros foram investigados para o encapsulamento de compostos (Sendil et al., 1999; Franceschi et al., 2008) tais como, os polihidroxicanoatos (PHAs), sendo o mais comum o poli (3-poli-hidroxi-butirato) PHB, com ponto de fusão relativamente alto e capacidade de cristalização rápida e, portanto, utilizado juntamente com o co-polímero 3- hidroxivalerato, PHV formando assim o PHBV produto mais estável, resistente e menos quebradiço (Pouton e Akhtar, 1996; Tao et al., 2009).

Da mesma forma, destacam-se os poliuretanos, compostos que vêm sendo empregados como suportes enzimáticos para reações em meio orgânico devido à sua resistência aos solventes orgânicos (Correia et al., 2011). A utilização de poliuretano tem sido relatada para aplicações clínicas, representando uma classe de materiais com alta biocompatibilidade e processabilidade (Dulinska-Molak et al., 2013).

As vantagens do uso de lipases imobilizadas em processos de esterificação são amplamente relatadas na literatura, considerando que esta proporcionaria a

elevação dos rendimentos do éster sob suaves condições de operação, dispensando etapas posteriores de purificação (Garcia et al., 2002). Esta tendência é vislumbrada nas reações de síntese enzimática para produção de ésteres aromáticos naturais, sendo a lipase o biocatalisador. Normalmente a indústria química sintetiza os aromatizantes e flavorizantes usando catalisadores químicos os quais, geralmente, levam à formação de subprodutos indesejáveis, e alto consumo de energia, assim a síntese enzimática surge como uma possibilidade de superar estes inconvenientes, além de tornar o processo ambientalmente favorável (Chiaradia et al., 2011).

No entanto, um grande inconveniente que se encontra atualmente é o alto custo envolvido com o uso de enzimas imobilizadas (Chiaradia et al., 2011; Valério et al., 2009; Dalla Rosa et al., 2008). Neste sentido, a busca por um biocatalisador “ideal e de baixo custo”, respondendo às necessidades do mercado e às vantagens da utilização de lipases imobilizadas em relação ao potencial de aplicação destas, consolidaram a proposta desta pesquisa, cujos objetivos foram traçados e serão apresentados a seguir.

1.1 Objetivos

O presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento da técnica de Dispersão de Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (SEDS) para imobilização de lipases utilizando dióxido de carbono pressurizado como antissolvente, e o polímero natural Poli (3-hidroxi-butilato-co-hidroxi-valerato) (PHBV) como agente encapsulante, em comparação à espuma de poliuretano (PU), buscando avaliar a eficiência da imobilização, estabilidade e a capacidade de ciclos reacionais do biocatalisador imobilizado nos diferentes suportes para a posterior aplicação destes em reações de síntese, na obtenção de produtos de interesse científico e tecnológico.

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Realização do estudo da solubilidade das lipases de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) (Amano PS) e de *Candida antarctica* B (CalB Líquida), em diclorometano e água.

- Avaliação da imobilização à alta pressão pela co-precipitação da lipase Amano PS de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) em PHBV:
 - Avaliação da influência das variáveis do processo, concentração de polímero, concentração de enzima, pressão, temperatura, vazão da solução enzimática, vazão do CO₂ e diâmetro do capilar na distribuição de tamanho das partículas;
 - Avaliação da eficiência do encapsulamento utilizando fluidos supercríticos pela atividade de hidrólise.

- Avaliação da imobilização à baixa pressão da lipase de *Candida antarctica* B (CalB) em nanopartículas de PHBV:
 - Verificação da precipitação do polímero PHBV utilizando a técnica SEDS, para formação de nanopartículas;
 - Imobilização da lipase *Candida antarctica* B solúvel utilizando o método de adsorção em baixa pressão (pressão atmosférica);
 - Realização do estudo dos parâmetros de imobilização: tempo de contato da enzima com o suporte (30 a 150 min), pH (5 a 10), da solução enzimática usada no processo de imobilização e verificação do rendimento do processo de imobilização;
 - Avaliação da estabilidade da enzima livre e imobilizada a baixa (4 °C) e alta temperatura (40, 60 e 80 °C).
 - Verificação da capacidade de ciclos reacionais possíveis do imobilizado, através da sua utilização no meio reacional para dosagem da atividade de síntese, indicando potencial de ampliação do seu uso em reações de interesse.

- Avaliação da imobilização à baixa pressão da lipase de *Candida antarctica* B em espuma de poliuretano:

- Imobilização da lipase de *Candida antactica B* solúvel em espuma de poliuretano utilizando o método de encapsulamento/inclusão;
 - Avaliação da estabilidade da enzima livre e imobilizada a baixa (4 °C) e alta temperatura (40, 60 e 80 °C).
 - Verificação da capacidade de ciclos reacionais possíveis do imobilizado, através da sua utilização no meio reacional para dosagem da atividade de síntese, indicando potencial de ampliação do seu uso em reações de interesse.
- Verificação morfológica e estrutura dos suportes e dos imobilizados obtidos:
 - BET das nanopartículas de PHBV;
 - MEV das nanopartículas de PHBV e CalB imobilizada em PHBV;
 - DRX das nanopartículas de PHBV e CalB imobilizada em PHBV;
 - DRX das espumas de PU e CalB imobilizada em PU.
 - Avaliação da aplicação da lipase CalB imobilizada em PHBV e PU; na catálise de reações de interesse industrial:
 - Reação de síntese utilizando geraniol e ácido oléico como substratos
 - Reação de síntese utilizando geraniol e ácido propiônico como substratos
 - Reação de síntese utilizando ácido oleico e etanol como substratos.

A descrição do presente estudo foi realizada em capítulos, sendo que no Capítulo 2 será apresentada a revisão da literatura sobre as técnicas e suportes empregados para imobilização de lipases finalizando com a aplicação de enzimas imobilizadas, buscando assim, realizar a fundamentação teórica para todas as etapas deste estudo.

No Capítulo 3 serão descritos os materiais empregados nos experimentos, como o aparato experimental utilizado para obtenção das lipases imobilizadas, bem como as metodologias empregadas em todo o processo de imobilização e no estudo da aplicação do imobilizado em reações de síntese. Os resultados obtidos neste estudo serão relatados e discutidos no Capítulo 4, sendo subdivididos na imobilização de duas lipases comerciais (Amano PS e CalB), em sistema a alta e baixa pressão com suporte PHBV e espuma de poliuretano. Na sequência, os resultados e discussão sobre a aplicação destes em reações de interesse serão abordados.

No Capítulo 5 serão apresentadas as conclusões obtidas após a realização dos experimentos e discussão dos resultados e, finalmente, as sugestões para trabalhos futuros referentes à presente pesquisa. O Capítulo 6 apresenta as referências bibliográficas relevantes ao desenvolvimento deste trabalho.

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 às lipases comerciais Amano PS e 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

As enzimas têm sido usadas em sua forma nativa há séculos na indústria de alimentos, e mais recentemente, graças a avanços tecnológicos, nas indústrias farmacêutica e química. O elevado desempenho catalítico apresentado por essas proteínas em condições brandas de reação (temperaturas amenas, pH neutros e meio aquoso/orgânico), e a sua versatilidade, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação, as torna atraentes para aplicações em processos industriais (Marzzoco e Torres, 1999; Dalla Vecchia et al., 2004). A existência deste panorama possibilitaria uma redução de custos fixos e variáveis em relação aos catalisadores químicos tradicionais.

2.1.1 Lipases

Dentre as inúmeras enzimas aplicadas industrialmente 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 formando, assim, um grupo de enzimas com relevância biotecnológica. A relação entre as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) normalmente são controladas pelo conteúdo de água do meio de reação (Carvalho et al., 2003; Dalla Vecchia et al., 2004; Hasan et al., 2009).

Desta forma, as lipases são biocatalisadores flexíveis e proporcionam uma grande variedade de reações de bioconversão, tais como a hidrólise, interesterificação, esterificação, alcoólise, acidólise e aminólise. As lipases podem atuar sobre uma variedade de substratos, incluindo óleos naturais, triglicerídeos sintéticos e ésteres de ácidos graxos (Dalla Vecchia et al., 2004; Aravindan et al., 2007; Hasan et al., 2009).

O uso de lipases como catalisadores vem contribuindo para o rápido crescimento da área de síntese orgânica quiral. A pesquisa nesta área busca a descoberta de enzimas, mais eficientes que as atuais, novos compostos alvo, e também de novos suportes sólidos convenientes, capazes de sustentar a atividade enzimática em meio orgânico. Neste contexto, ressalta-se a reutilização de enzimas imobilizadas, uma excelente abordagem para química verde, além de possibilidade de redução do custo do processo e da quantidade necessária desses biocatalisadores, em geral, de alto valor agregado (Andrade et al., 2010).

Considerando a tecnologia enzimática, ressalta-se, segundo os autores Castro et al. (2004) e Hasan et al. (2006), as maiores empresas produtoras mundiais de lipases: Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozymes (Dinamarca), Genencor International (EUA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão).

2.1.1.1 Lipase Amano PS

Algumas características da lipase Amano PS de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) são destacadas como esta ser constituída de 320 aminoácidos, massa molar 33 KDa, possuir alta preferência pela hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa (Kim et al., 1997) e como biocatalisador apresenta versatilidade e alta estabilidade para reações específicas (Pan et al., 2010).

Recentemente, a lipase de *Burkholderia cepacia* vem sendo investigada como biocatalisador em uma variedade de reações sintéticas, tais como hidrólise, acilação enantiosseletiva e transesterificação (Andrade et al., 2010).

2.1.1.2 Lipase de *Candida antarctica* B (CalB)

A lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CalB) possui estrutura globular, sendo constituída de 317 resíduos de aminoácidos, possui dimensões de 30 Å x 40 Å x 50 Å massa molecular (MM) de 33 kDa, pH ótimo entre 7 e 8 e o ponto isoelétrico (pI) de 6,0 (Uppenberg et al., 1994; Brigida et al., 2008). A lipase CalB consiste em uma interessante lipase, considerando o seu potencial de aplicação em vários processos industriais (Arroyo et al., 1999).

Assim, nos últimos anos, pesquisadores têm mostrado interesse na lipase de *Candida antarctica*, devido a suas propriedades, como a termoestabilidade e estabilidade em pHs ácidos (María et al., 2004). Cabe ressaltar que apresenta uma característica peculiar em seu sítio catalítico, relacionado à habilidade em catalisar diferentes transformações químicas, característica interessante a ser investigada em pesquisas sobre as possibilidades de uso da enzima (Faber, 1997; Kwon et al., 2007).

2.1.2 Aplicações industriais de lipases

A aplicação das lipases como biocatalisadores em processos industriais tem ocorrido em indústrias alimentícias, têxtil, de papel; e celulose, detergentes, óleos e gorduras, etc. Assim, esta classe de enzimas vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais com novas aplicações biotecnológicas estabelecidas com sucesso na síntese de biopolímeros e biodiesel, a produção de compostos farmacêuticos enantiopuros, agroquímicos e sabores (flavour) (Dalla Vecchia et al., 2004; Castro et al., 2004; Brigida, 2006; Hasan et al., 2009; Kapoor e Gupta, 2012).

Assim, fazem parte de um grupo de enzimas onde o interesse comercial tem aumentado, em função da possibilidade de reverter sua forma de atuação em meio orgânico, de tal forma que reações de esterificação e interesterificação possam ser conduzidas. 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 (Castro et al., 2004; Aravindan et al., 2007; Idris e Bukhari, 2012).

Na indústria de alimentos, as lipases são usadas para geração de bens de consumo em reações de degradação de óleos e gorduras, manufatura de fermento e queijo, tratamento de efluentes, biossensores para utilização em análises de alimentos, e de contaminação de ambientes, síntese de ésteres, como agentes aromatizantes na indústria alimentar, entre outras (Hasan et al., 2006; Martins et al., 2008; Machado, 2011).

Castilho (2001) enfatiza a importância para a escolha da enzima “ideal” que será conduzida após cuidadosa investigação sobre os fatores que influenciam sua aplicação em processos industriais. Esta definição repercute na necessidade de estudos quanto ao uso de lipases principalmente em aplicações industriais de larga escala, em virtude de suas características peculiares: biocatalisadores acessíveis, ou seja, de fácil produção, baixo custo de geração, não requerimento de cofatores, operação em condições brandas de temperatura e pH, minimização de problemas de isomerização, racemização e rearranjo e estabilidade à solventes orgânicos.

Neste contexto, muitos dos ésteres disponíveis são produzidos por sínteses enzimáticas. A produção biotecnológica de ésteres utilizando lipases tem recebido atenção devido às condições de reações brandas (temperatura, pH e pressão) envolvidas, o elevado grau de pureza alcançado, bem como a aceitação destes produtos na indústria de alimentos (Martínez et al., 2004).

A síntese enzimática do oleato de etila e de outros ésteres do ácido oleico em solventes orgânicos por exemplo, têm sido estudada utilizando-se lipases de pâncreas de porco e de 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, 2004; María et al., 2004; Foresti e Ferreira 2005). Neste contexto, diferentes exemplos de aplicações industriais de lipase podem ser observados de forma mais clara na Tabela 1, onde encontra-se especificado o tipo de reação catalisada e seu produto.

Tabela 1 - Aplicações industriais de lipases.

Area industrial	Aplicação	Produto	Referências
Alimentação	Trans esterificação de óleos naturais	Oleos e gorduras modificadas	Carvalho et al. (2003) Castro et al. (2004) Brusamarelo et al. (2010) Mendes et al. (2011)
	Hidrólise de oleos (ácidos graxos), di e monoglicérides	Agentes flavorizantes e aromas para alimentos e bebidas	Pandey et al. (1999) Reetz (2002) Hasan et al. (2006)
Química	Trans esterificação de óleos vegetais	Biodiesel	Dalla Rosa et al. (2008) Dalla Rosa et al. (2009)
	Remoção de manchas/gordura	Detergentes	Paques e Macedo (2006)
	Pre-tratamento enzimático de efluentes oriundos de abatedouros e industrias de laticios	Resíduos contendo menos gordura	Mendes et al. (2005) Basheer et al. (2011) Saliyu et al. (2012)
	Síntese de esteres	Esteres, emulsificantes	Lozano et al. (2004) Paroul et al. (2011)
Médica	Dosagem de triglicérides do sangue e resolução enantioselectiva	Kits diagnosticos (R,S)-ibuprofeno, (R,S)-naproxeno	Sharma et al. (2001)
Cosméticos	Síntese de esteres	Fragância para perfumes	Paroul et al. (2010)

A lipase de CalB encontra-se comercialmente disponível em forma de formulações para aplicações em solventes orgânicos ou meio aquoso. Estas formulações são bastante ativas mesmo em baixa atividade de água e podem tolerar solventes relativamente polares como a acetonitrila (Rotticci et al., 2000). Muito tem

sido publicado sobre o uso de lipases para catalisar biotransformações, várias dessas reações são realizadas em meios não aquosos. Certamente, a lipase de CalB tem sido uma das lipases mais amplamente investigada neste sentido (Ventura et al., 2011).

Dentre as principais aplicações da lipase de CalB em processos industriais, destacam-se a: síntese de compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica (Arroyo et al., 1999; Straathof et al., 2002), síntese de ésteres usados na indústria de aromas (Lozano et al., 2002; Larios et al., 2004; Passicos et al., 2004; Mateo et al., 2005); síntese de oleato de etila, para aplicações em indústrias de cosméticos, lubrificantes, alimentos e fármacos; síntese de lactato de butila, éster bastante utilizado em indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica por possuir propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes (Pirozzi e Greco Junior, 2004), síntese de ésteres de vitaminas, objetivando tornar estas últimas solúveis em óleo para adição em produtos alimentícios e outras como síntese de açúcares (glicícol) (Maugard e Legoy, 2000; Adamczak et al., 2005).

2.2 Estabilidade das lipases

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação (Dalla Vecchia et al., 2004; Poojari e Clarson, 2013).

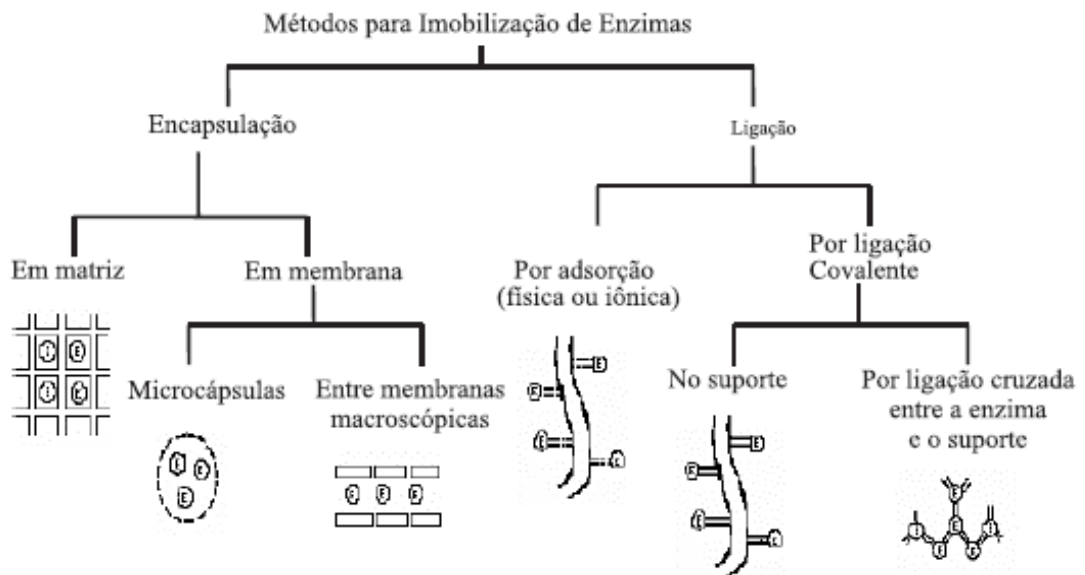
Portanto, o principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade (térmica, operacional e de estocagem) que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. A estabilidade térmica da CalB imobilizada a 40, 50, 55, 60 e 70 °C tem sido reportada nos trabalhos de Arroyo et al. (1999), Cruz et al. (2009), Silva et al. (2012a) e Poojari e Clarson (2013).

A avaliação da estabilidade operacional da CalB imobilizada foi reportada por Magnan et al. (2004) para síntese de butil acetato por 4 ciclos e Rodrigues et al. (2008) para síntese de butil butirato sendo eficiente por 6 ciclos.

2.3 Métodos para Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas tem sido uma estratégia para a maioria das aplicações em grande escala devido à facilidade de reutilização do catalisador, operação contínua e purificação do produto (Kim et al., 2006). A Figura 1 apresenta, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

Figura 1- Métodos de imobilização de enzimas (Dalla Vecchia et al., 2004).



O desempenho da enzima imobilizada depende em grande parte da estrutura do suporte (Wang et al., 2009). Assim, apresenta-se a seguir, de maneira sucinta, algumas técnicas que vêm sendo empregadas para a imobilização de enzimas.

2.3.1 Encapsulamento

2.3.1.1 Matriz

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., 1987).

A vantagem da encapsulação de enzimas se deve a grande área superficial de contato entre o substrato e a enzima no interior do suporte, porém, existem algumas desvantagens que devem ser levadas em consideração, como a possível inativação da enzima durante o processo de imobilização, os possíveis efeitos de inibição por produtos no interior da matriz e a alta concentração de enzima que é necessária (Mariotti, 2000; Dalla Vecchia et al., 2004; Mendes et al., 2011; Datta et al., 2013).

2.3.1.2 Membranas

Neste método a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável, que por sua vez pode ser subdividido em:

Encapsulamento: A enzima é imobilizada no interior de esferas, cujo envoltório é constituído por um polímero geliforme e semipermeável. O procedimento clássico consiste em se dissolver a enzima em uma solução aquosa de alginato de sódio, que é gotejada sobre uma solução aquosa contendo íons bivalentes (Ca^{2+} , por exemplo). Tão logo a gota de alginato de sódio entra em contato com a solução salina, forma-se uma esfera, dentro da qual as moléculas de enzima ficam retidas, cuja membrana é constituída pelo polímero de alginato de cálcio (Lima et al., 2001).

Membranas fibrosas semipermeáveis: Este método de imobilização consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semipermeável (diâmetro médio de poros da ordem de 200 μm). Nesse caso não há riscos de desnaturação da enzima, pois não são empregados reagentes químicos. No entanto, as limitações difusionais são intensas (Lima et al., 2001).

Microencapsulamento: Basicamente consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima está confinada no interior de micelas. Assim, mistura-se num recipiente adequado a solução aquosa de enzimas,

hexametilenodiamina, fase orgânica, emulsificante e cloreto de sebacila. O tamanho das microcápsulas e as propriedades da membrana são determinadas pelos fatores: composição da mistura, concentração dos reagentes, agitação e tempo de reação (Lima et al., 2001).

Entrelaçamento em triacetato de celulose: Este método pode ser considerado como um caso particular do processo de microencapsulação, e que consiste do seguinte: a solução aquosa contendo a enzima é dispersa numa solução de triacetato de celulose em cloreto de metileno. A mistura é extrudada através de finos orifícios e é recolhida num recipiente contendo tolueno. Como o triacetato de celulose é insolúvel nesse solvente, forma-se então um coágulo fibroso em cujas fibras as moléculas da enzima ficam retidas (Lima et al., 2001).

Entrelaçamento em polímeros: Consiste no aprisionamento das moléculas de enzima entre as malhas de um polímero geliforme, o qual é preparado da seguinte maneira: num recipiente adequado são colocados a enzima, um agente bifuncional (por ex., bisacrilamida) um monômero (por ex., 2-hidroximetilacrilamida) e uma substância geradora de radicais livres (por ex., persulfato de amônio). Depois de certo tempo ocorre a gelificação, e em seguida o gel é dividido em partículas de dimensões conhecidas (Lima et al., 2001).

2.3.2 Ligação

2.3.2.1 Adsorção

A imobilização de enzimas por adsorção ocorre quando uma enzima se liga a um suporte sólido através de interações iônicas, adsorção física, ligações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e força de Van der Waals ou mesmo por combinação destas interações. É um processo simples, suave e não deletério para a maioria das enzimas, sendo desprezíveis os efeitos difusionais (Lima et al., 2001; Brigida, 2006).

Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (Dalla Vecchia et al., 2004).

Os suportes para adsorção, tanto na fase sólida ou líquida, podem ser orgânicos (derivados da DEAE-celulose, Dowex,) e inorgânicos (celite, bentonita, alumina, argilas, zeólitas, Accurel), entre outros (Lima et al., 2001; Scherer et al., 2011).

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, depende de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho do poros. O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação (Dalla Vecchia et al., 2004).

2.3.2.2 *Ligações covalentes*

A enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são, normalmente, estabelecidas entre os grupos aminos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte (-CHO; -NCS, dentre outros). Em geral, o processo é realizado em meio aquoso, à temperatura entre 0°C e 25 °C e pH próximo à neutralidade. A escolha das condições irá depender da estabilidade da enzima e do suporte frente ao pH de formação das ligações covalentes, assim como da estabilidade das ligações suporte-enzima frente ao pH de utilização do sistema imobilizado (Lima et al., 2001).

Existem inúmeros materiais que podem ser usados para imobilizar enzimas. A natureza física desses suportes pode variar, desde materiais geliformes até superfícies sólidas (lâminas de aço, pérolas de vidro, por ex.) recobertas com alguma substância capaz de interagir com a enzima (Lima et al., 2001).

Geralmente as condições de imobilização para uma dada enzima só poderão ser estabelecidas empiricamente. O procedimento consiste em imobilizar a enzima em vários suportes por meio de diferentes métodos, avaliando-se, a seguir, a atividade do sistema imobilizado. Logicamente, o binômio suporte-método mais adequado será aquele que propiciar maior atividade após a imobilização (Lima et al., 2001).

Uma revisão detalhada sobre imobilização de enzimas utilizando diversas técnicas, exceto as que utilizam fluidos supercríticos (FSC), pode ser encontrada no trabalho de Scherer et al. (2011), onde o mesmo utilizou vinte e um diferentes suportes inorgânicos para imobilização da lipase de pâncreas suíno.

Portanto, a escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá, essencialmente, de dois fatores: a) das características peculiares da enzima; b) das condições de uso da enzima imobilizada. Dado a variabilidade desses fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal (Lima et al., 2001).

2.4 Suportes para imobilização de enzimas

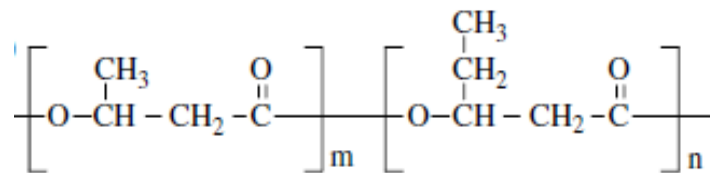
Não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, mas um número de características desejáveis comuns deve existir para aplicar na imobilização de enzimas. Entre elas inclui-se: alta afinidade para proteínas, presença de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e para modificações químicas, hidrofiliabilidade, estabilidade mecânica, regenerabilidade (Silva, 2007). Ainda, tem havido um crescente interesse em compostos biodegradáveis devido à preocupação com impacto ambiental. Inúmeros suportes têm sido apresentados na literatura para imobilização de enzimas. Ênfase será dada, neste capítulo, aos suportes utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

2.4.1 Poli (hidroxibutirato-co- hidroxivalerato)

Entre os vários plásticos biodegradáveis e disponíveis, polihidroxialcanoatos (PHAs), uma família de poliésteres alifáticos, vem ganhando interesse significativo. PHAs são poliésteres de diferentes hidroxialcanoatos que são sintetizados e acumulados intracelularmente como o carbono e material de armazenamento de energia em diversos microrganismos. Os PHAs são amplamente utilizados em várias aplicações biomédicas, incluindo a liberação de fármacos (drogas), devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (Costa et al., 2007; Javadi et al., 2010).

O tipo mais comum de PHAs é o poli (3-hidroxi-butirato) (PHB). O PHB possui propriedades semelhantes as do polipropileno (PP), como o ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítrea. Porém, o PHB é mais frágil que o PP, o que pode restringir suas aplicações. Em contrapartida, copolímeros de PHB com 3-hidroxi-valerato (PHBV) (Figura 2) são menos rígidos e mais resistentes (Costa et al., 2007).

Figura 2 - Fórmula estrutural plana do poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) (Tao et al., 2009).



O PHBV poli (β -hidroxi-butirato-co- β -hidroxi-valerato) é um poliéster alifático termoplástico ativo opticamente. Pode ser produzido por fermentação bacteriana de materiais naturais renováveis. Possui algumas propriedades desejáveis, tais como biodegradabilidade e biocompatibilidade (Wang et al., 2005; Tao et al., 2009).

Tao et al. (2009), têm reportado a utilização de blendas de PHBV e poli (propileno carbonato), visando estudar as características térmicas e velocidade de degradação.

Costa et al. (2007) relataram a micronização de poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) precipitado em uma solução de diclorometano utilizando a técnica antissolvente supercrítico (SAS). A pressão variou de 80 a 100 bar e a temperatura foi mantida fixa em 40 °C. Foram obtidas microesferas com diâmetros que variaram de 3 a 9 μm , sendo as melhores condições de processo 40 °C, 100 bar, 1 mL.min⁻¹ vazão de solução e 10 mL.min⁻¹ vazão de dióxido de carbono.

A utilização de microcápsulas de (poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), ou simplesmente PHBV, no campo da biomedicina vem ganhando importância. Como exemplo pode-se citar o estudo da avaliação da eficiência de encapsulamento da tetraciclina neutralizada onde obteve-se de 51,9 a 65,3% de encapsulamento do medicamento. Neste estudo foi verificada que biodegradabilidade não foi um

parâmetro significativo na liberação de microcápsulas, pois a liberação foi completa antes que qualquer sinal de degradação fosse observado (Sendil et al., 1999).

Franceschi et al. (2009) realizaram um estudo de precipitação de β -caroteno utilizando a técnica SEDS, onde foram avaliados o efeito da pressão (80 a 120 bar), temperatura (20 a 40 °C), vazão de antissolvente (20-40 mL.min⁻¹), vazão da solução (1 a 4 mL.min⁻¹) e concentração de β -caroteno (4 e 8 mg.mL⁻¹). Foram obtidas partículas precipitadas de β -caroteno com tamanho médio de 3,2 a 96,8 μ m nas seguintes condições: pressão de 80 bar, temperatura de 40 °C, vazão de antissolvente 40 mL.min⁻¹ e vazão da solução 1 mL.min⁻¹.

Priamo et al. (2010) estudaram o encapsulamento de β -caroteno em polímero PHBV com diclorometano como solvente orgânico, utilizando a técnica SEDS. Para os experimentos de precipitação com os compostos puros foram investigados a concentração de β -caroteno (4 e 8 mg.mL⁻¹) e PHBV (30 mg.mL⁻¹) na solução orgânica, pressão (80 a 200 bar), vazão da solução fixada em 1 mL.min⁻¹, vazão do antissolvente 40 mL.min⁻¹ e temperatura constante de 40 °C.

Nos experimentos de co-precipitação foram avaliados a concentração de β -caroteno (2 a 30 mg.mL⁻¹) sendo mantidas fixas: concentração de PHBV (30 mg.mL⁻¹), temperatura (40 °C), pressão (80 bar), vazão da solução (1 mL.min⁻¹) e vazão do antissolvente (40 mL.min⁻¹). Os resultados de encapsulamento mostram que o aumento da concentração de β -caroteno resulta em um aumento do percentual de soluto encapsulado, aumentando a eficiência de encapsulamento (Priamo et al., 2010).

A preparação de produtos que liberam a droga requer a utilização de uma fase móvel que se dissolve e carrega o componente da droga, que também se expande e se estende na matriz polimérica, facilitando a difusão da droga e aumentando a taxa de impregnação. Convencionalmente, a preparação destes sistemas envolve três etapas: solubilização do fármaco em um solvente adequado, difusão do fármaco através do polímero e eliminação do solvente residual (Duarte et al., 2007). Polímeros têm sido impregnados com medicamentos pela dissolução da droga em um fluido supercrítico e por contato da mistura do fluido resultante com as partículas do polímero sendo impregnadas (Cocero et al., 2009).

Assim, a geração de partículas é certamente uma área de intenso estudo e vem recebendo a atenção principalmente das indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. Nas aplicações abordadas até agora, a característica comum foi um solvente na fase fluido, sendo que o CO₂ é o mais amplamente empregado. Para estas aplicações pode-se tomar vantagem da proximidade do ponto crítico e das propriedades termodinâmicas nesta região. Sabe-se que o CO₂ dissolvido provoca uma redução considerável na viscosidade do polímero fundido, devido ao aumento no volume livre (Kikic, 2009).

Impregnação utilizando tecnologia supercrítica provou ser viável quando o composto é solúvel em dióxido de carbono e o polímero pode ser impregnado pelo fluido supercrítico. Um produto de alta pureza, livre de solventes residuais é obtido, uma vez que solventes orgânicos estão envolvidos no processo de impregnação. Os fluidos supercríticos, especialmente dióxido de carbono supercrítico, foram identificados como os principais compostos para desenvolver processos alternativos limpos para a preparação de fármacos envolvidos em matrizes poliméricas. Quando ocorre a despressurização, o gás se difunde rapidamente para fora do polímero, desplastificando-o e garantindo a completa remoção de solvente, sem expor os polímeros e fármacos a altas temperaturas, que podem degradá-los (Duarte et al., 2007).

2.4.2 Processos de formação de micro e nanopartículas empregando fluidos pressurizados

Os fluidos supercríticos (FSCs) têm sido propostos como meios para a produção de nanomateriais. As propriedades que fazem os fluidos supercríticos particularmente atraentes são a difusividade como gás, o poder solvente continuamente ajustável, a seletividade e a possibilidade de sua eliminação completa no final do processo (Reverchon e Adami, 2006).

O CO₂ é o fluido supercrítico mais amplamente utilizado devido a suas propriedades físicas perto de seu ponto crítico ($T_c = 31,1^\circ\text{C}$, $P_c = 73,8 \text{ bar}$), além disso, não é tóxico, é quimicamente inerte e relativamente barato (Wu e Li, 2008; Kang et al., 2008; Kikic, 2009).

A utilização de fluidos supercríticos em tecnologias para processamento de polímeros inclui a polimerização, fracionamento, formação de espuma, tingimento /impregnação, encapsulamento e micronização (Kikic, 2009). Na indústria alimentícia, os FSC têm sido utilizados em processos em grande escala como a descafeinação de grãos de café e folhas de chá preto e na extração de sabores amargos (ácidos) a partir do lúpulo. Em processos de menor escala refere-se à extração e concentração de óleos essenciais, aromatizantes e oleorresinas de alto valor agregado, e à remoção de pesticidas de material vegetal (Brunner, 2005).

A tecnologia de alta pressão também tem sido utilizada para inativação enzimática, porém não há evidências de que a alta pressão possa provocar estabilização e ativação de algumas enzimas. Dentre as várias estratégias empregadas para aumentar a estabilidade da enzima, inclui-se: a engenharia genética e a imobilização, que atuam em meios não aquosos (Eisenmenger e Reyes-de-Corcuera, 2009).

Na literatura estão reportadas várias técnicas de micronização que levam em consideração as características específicas dos fluidos sub e/ou supercríticos. As técnicas de micronização podem ser interessantes para uso como suportes nanoestruturados, os quais segundo os pesquisadores Wang et al. (2009) são capazes de manter a atividade catalítica, bem como garantir a eficiência de imobilização da enzima.

Estas técnicas estão divididas em três categorias principais que empregam CO₂ como fluido pressurizado na forma de solvente, soluto ou antissolvente.

2.4.2.1 Fluidos supercríticos como solventes: (RESS, SSI)

O processo de Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS) envolve a precipitação do soluto em uma solução supercrítica homogênea pela rápida expansão da mesma em condições ambientes de temperatura e pressão. O processo RESS também tem sido usado para produzir compostos (Cocero et al., 2009).

Entretanto, a principal limitação das técnicas de precipitação é a baixa solubilidade de muitas substâncias em CO₂ supercrítico. Esta limitação é, obviamente, ainda mais grave para aplicações de co-precipitação em que o suporte

e a substância ativa tem de ser solúveis em CO₂ supercrítico. No entanto, há algumas aplicações relacionadas ao encapsulamento de fármacos em biopolímeros (Cocero et al., 2009).

Polímeros podem ser impregnados com drogas pela dissolução da droga em um fluido supercrítico e em seguida, entram em contato com a mistura resultante do fluido com as partículas do polímero a serem impregnadas. Este processo é chamado Impregnação de Solvente Supercrítico (SSI). É possível dissolver outra substância no CO₂ para melhorar a solubilidade da droga (co-solvente) ou para melhorar a dispersão da droga no polímero (surfactante) (Cocero et al., 2009).

Várias propriedades dos produtos tais como encapsulamento da droga ou penetração profunda da droga podem ser modificadas pelo ajuste dos parâmetros como a taxa de despressurização, o tempo de impregnação e pela mudança de densidade do solvente através da mudança de pressão e temperatura. A incorporação da droga para dentro do polímero pode ocorrer por precipitação da droga durante a despressurização pelo processo RESS. Um mecanismo alternativo que pode resultar em características muito melhores do produto é a impregnação de drogas para dentro do polímero durante o processo com a alta pressão, devido à afinidade do soluto com a matriz polimérica. A impregnação da droga por esse mecanismo é auxiliado pelo efeito de plastificação e inchaço causado pela dissolução do CO₂ dentro do polímero (Cocero et al., 2009).

2.4.2.2 Fluidos supercríticos como soluto: Partículas de Soluções Saturadas em Gás (PGSS)

A técnica das Partículas de Soluções Saturadas em Gás (PGSS) emprega fluidos sub ou supercríticos como soluto. Este processo é indicado para formar partículas de materiais que absorvem fluidos supercríticos em altas concentrações. O fluido supercrítico ou gás comprimido é dissolvido em um material sólido fundido e esta mistura a alta pressão é rapidamente despressurizada acarretando na formação de partículas por precipitação devido ao efeito intenso de resfriamento causado pela liberação de CO₂ (Cocero et al., 2009; Franceschi, 2009).

O processo PGSS é especialmente adequado para produzir partículas de polímeros e também para incorporação de substâncias ativas dentro dessas partículas. Nesta aplicação, o efeito de plastificação e o inchaço causado pela

dissolução de CO₂ pode aumentar novamente a incorporação da substância ativa. O processo PGSS também pode ser usado para a geração de partículas de fluido. Neste processo, o material de suporte utilizado é derretido, sendo misturado com o líquido a ser encapsulado. Ambos os componentes são pressurizadas com bombas e administrado em um sistema de mistura. Como no processo de SSI, a substância ativa pode ser incorporada ao sistema ou de um modo segregado (formando partículas distintas), ou por adsorção no sistema (Cocero et al., 2009).

2.4.2.3 Fluidos supercríticos como antissolventes: (GAS/SAS/PCA/ASES/SEDS/SFEE)

Neste processo, o fluido supercrítico é utilizado como um antissolvente que provoca precipitação de substratos inicialmente dissolvidos em um solvente líquido.

A precipitação com Antissolvente Supercrítico (SAS) é baseado no contato de uma solução de solutos de interesse em um líquido solvente convencional com um fluido supercrítico. Após a mistura, o fluido supercrítico satura o líquido solvente e esgota-o por extração. A saturação do solvente líquido pelo fluido supercrítico provoca a precipitação do soluto por um efeito antissolvente (Cocero et al., 2009).

No método Gás Antissolvente (GAS), uma quantidade da solução é expandida várias vezes, misturando com um gás denso. Devido à dissolução do gás comprimido, o solvente expande tendo uma força menor do que o solvente puro. A mistura fica supersaturada, levando a precipitação do soluto em micropartículas (Jung e Perrut, 2001).

Na técnica de Precipitação do Antissolvente Comprimido (PCA), a câmara de precipitação é carregada com o antissolvente comprimido e a solução é aspergida para o interior da câmara contendo o antissolvente. No momento em que um determinado volume da solução tiver sido aspergido no antissolvente, a aspensão desta é interrompida e é iniciada a passagem de antissolvente pela câmara de precipitação para realizar a secagem das partículas precipitadas (Franceschi, 2009).

O processo de Dispersão da Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (SEDS) consiste em um decréscimo do poder solvente do solvente líquido onde o substrato encontra-se dissolvido, pela saturação do dióxido de carbono em

condições supercríticas, causando a precipitação do substrato ou recristalização (Jung e Perrut, 2001).

No método SEDS, o dióxido de carbono supercrítico é o agente de dispersão, além de ser um antissolvente. Neste método de dispersão a mistura é mais vigorosa gerando partículas menores do que aquelas obtidas no método SAS (Bahrami e Ranjbarin, 2007).

Franceschi et al. (2008), reportaram com sucesso a utilização da técnica SEDS para precipitação de β -catoteno puro e copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) PHBV, utilizando dióxido de carbono supercrítico como antissolvente.

Sistema de Extração de Solvente em Aerossol (ASES) consiste no processo de pulverização do substrato em solventes orgânicos. A dissolução do fluido supercrítico nas gotículas de líquido é acompanhada por uma expansão de grande volume e, conseqüentemente, uma diminuição do poder de solvente líquido, causando um aumento acentuado da supersaturação na mistura líquida, e a conseqüente formação de partículas pequenas e uniformes (Jung e Perrut, 2001).

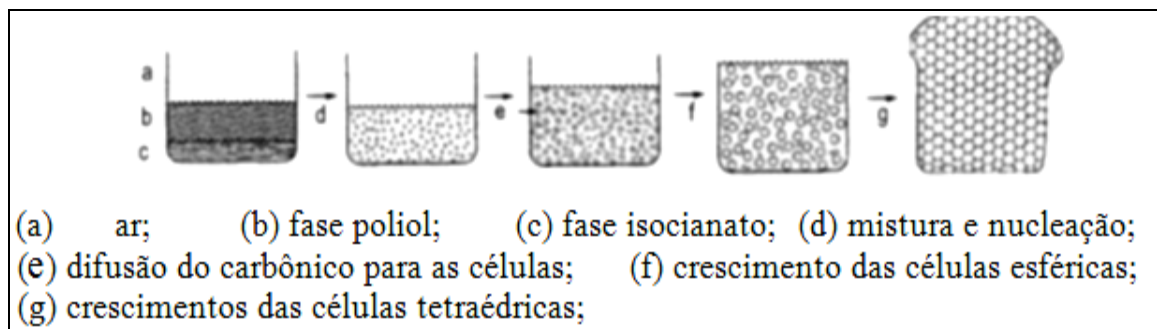
A Extração de Emulsões por Fluidos Supercríticos (SFEE) vem surgindo como meio alternativo de encapsulamento. Aplicação de fluidos supercríticos na tecnologia de partículas com emulsões aparece como uma decisão natural para evitar os principais problemas de cada uma das tecnologias separadas. Técnicas de emulsões normalmente envolvem grandes quantidades de solventes orgânicos, e a remoção deles envolve técnicas de separação adicionais e o uso de altas temperaturas (Cocero et al., 2009).

2.4.2 Espumas de poliuretano

Os poliuretanos (PUs) são formados pela reação de adição entre um isocianato, composto que contém o grupo $[-N=C=O]$ e um hidrogênio ácido (H+) existente em outro composto. A reação de adição ocorre através da dupla ligação $C=N$, sendo a reação mais importante a que ocorre entre um isocianato e um composto que contenha o grupo $-OH$ (hidroxila), formando ésteres carbâmicos, denominados uretanos (Matsui, 2007).

As etapas de polimerização estão apresentadas na Figura 3 onde claramente pode ser visualizado o esquema que representa a nucleação e o crescimento da espuma de PU (Vilar, 2013).

Figura 3 - Esquema representativo das etapas para formação da espuma de PU (Vilar, 2013).



Poliuretanos são amplamente utilizados em vários campos, tais como a produção de espumas de plástico, almofadas, artigos de borracha, sintéticos couros, adesivos, tintas, e fibras. Eles são considerados uma tecnologia promissora para uso como suportes para imobilização de enzimas para uso em reações em meios orgânicos, considerando que estes possuem propriedades únicas tais como a resistência a óleos, solventes e gorduras (Guncheva et al., 2011).

A aplicação dos PUs como suportes enzimáticos aplicados em reações em meio orgânico foi descrita por Correia et al. (2011). Os autores consideraram a sua resistência aos solventes orgânicos, onde neste caso a lipase ficou retida na estrutura porosa da matriz por meio de ligações covalentes.

A utilização de poliuretano na imobilização de enzimas também foi relatado por Silva et al. (2013) utilizando inulinase de *Aspergillus niger*. A avaliação da estabilidade operacional foi verificada por 60 dias utilizando sacarose e inulina como substratos, resultando 49,7 e 49,4 % da atividade inicial, respectivamente por 1008 h e 24 ciclos.

A imobilização de *Candida rugosa* em espumas de poliuretano foi relatada no trabalho de Pires-Cabral et al. (2007) para produção de etil butirato.

Portanto, materiais de poliuretano podem ser utilizados nas seguintes formas: espumas, microesferas, microcápsulas, nanopartículas e membranas, em áreas da bioquímica e biotecnologia, como suportes adequados para imobilização de enzimas (Garcia, 2010).

2.5 Enzimas Imobilizadas

O uso de enzimas na forma livre como catalisadores para reações de interesse pode tornar o processo muito dispendioso e seu descarte após o uso economicamente inviável (Silva et al., 2009). O aumento do número de possibilidades de aplicações das enzimas, em reações de biotransformação, demanda um biocatalisador imobilizado eficiente, possibilitando ainda o reuso de lipases caras, como também, conduzindo a um aumento da estabilidade e da atividade da enzima (Balcão et al., 1996; Anderson et al., 1998; Sharma et al., 2001; Pires-Cabral et al., 2010).

2.5.1 Imobilização em sistema à alta pressão

A utilização de fluidos supercríticos na precipitação e co-precipitação de suportes, bem como enzimas, será relatado a seguir em diferentes trabalhos presentes na literatura.

Young et al. (1999) apresentaram um estudo de encapsulamento da enzima lisozima em solvente diclorometano, encapsulada em microesferas de polímeros biodegradáveis I-PLA e PGLA através da técnica de Precipitação do Antissolvente Comprimido (PCA) com dióxido de carbono como antissolvente. As soluções de polímeros I-PLA e PGLA foram precipitadas formando partículas de 5 a 70 μm em condições de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ com capilar de 100 μm , para encapsulamento das partículas de lisozima (1-10 μm), ressaltando que o polímero I-PLA gerou grande formação de partículas aglomeradas.

Moshashaée et al. (2000) estudaram a precipitação de lisozima liofilizada dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO), através da técnica de Dispersão de Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (SEDS) utilizando CO_2 como antissolvente. Os

parâmetros estudados foram: pressão (80 a 150 bar), temperatura (40 a 50 °C), concentração de enzima (0,5 a 1,5 mL.min⁻¹), vazão da solução (0,2 a 0,6 mL.min⁻¹) e vazão CO₂ (18 a 30 mL.min⁻¹). Os autores observaram que a pressão influenciou na morfologia das partículas formadas com tamanho de 1 a 5 µm, contendo < 20 ppm de solvente residual, com o aumento das pressões, havia maior formação de aglomerados, além disso na pressão de 80 bar e temperatura de 40 °C houve 50% de perda da atividade.

Micronização e micro-encapsulamento de lisozima e ácido p-hidroxibenzóico (p-HBA) foi estudado através do Sistema de Extração de Solvente em Aerossol (ASES) com um polímero biodegradável L-PLA, a partir de várias soluções orgânicas. O solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) e os parâmetros estudados foram: pressão (76 a 94 bar), temperatura (6 a 40 °C), concentração da solução, sistema solvente e velocidade de pulverização. A lisozima foi precipitada a 25 °C e 94 bar formando partículas de 750 nm. A co-precipitação de lisozima/L-PLA foi realizada a 25 °C e 92 bar. A eficiência de encapsulamento máximo para partículas p-HBA/L-PLA obtida foi de 9,2%, sendo obtida uma redução do tamanho efetivo das partículas em temperaturas de baixas a moderadas (Tu et al., 2002).

O encapsulamento de lisozima em polímero PGLA também foi estudado utilizando o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), através da técnica de Extração de Emulsões por Fluidos Supercríticos (SFEE). Com a variação da concentração PLGA e velocidade de agitação durante a preparação da emulsão, partículas de PLGA puras, com tamanho médio de 100 nm foram produzidos a temperatura de 45 °C, pressão de 80 bar e vazão da solução de 2 mL.min⁻¹. A eficiência do encapsulamento com o método de suspensão em emulsões *in situ*, foi de até 48,5%. Não foram reportadas medidas de atividade da enzima lisozima (Kluge et al., 2009).

A precipitação de lisozima em dimetilsulfóxido (DMSO) foi estudada pelos autores Fusaro et al. (2009) utilizando a técnica PCA e tendo CO₂ como antissolvente. Os parâmetros avaliados foram: temperatura (25 a 40 °C), pressão (100 a 150 bar), vazão da solução (0,4 a 2 mL.min⁻¹) e vazão de CO₂ (40 a 120 g.min⁻¹). Foram formadas partículas entre 100 e 200 nm.

Glicose oxidase (GOX) de *Aspergillus niger* foi imobilizada em duas matrizes com diferentes polímeros (filmes e espuma de poliuretano (PU)) em dióxido de

carbono supercrítico para aplicação em preparações de biossensores. Dióxido de carbono supercrítico foi utilizado para expansão do polímero e formação da espuma, para posterior encapsulamento. Foram avaliados o efeito da temperatura de imobilização (25-50 °C), pressão (de 0,1 a 15 MPa) e tempo de imobilização (4-72 h) sobre a atividade das amostras de GOX/PU imobilizados. A medida da atividade foi efetuada para amostras preparadas em 8, 15 e a10 MPa, sendo obtidas 52, 74 e 165%, respectivamente de eficiência de imobilização, maiores que as obtidas na ausência do CO₂ supercrítico (Inoglu et al., 2008).

Além de serem utilizados como antissolventes para formação de compostos, os fluidos supercríticos vêm sendo estudados no tratamento de enzimas imobilizadas, conforme relatado pelos autores Oliveira et al. (2006) onde foi utilizado o dióxido de carbono na lipase Novozym 435. Assim como a aplicação de propano no tratamento de lipases comerciais de Amano PS (Franken et al., 2010) e não comerciais de *Penicillium simplicissimum* e *Aspergillus parasiticus* visando aumentar a estabilidade das enzimas (Kuhn et al., 2010) além do tratamento da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 (Kuhn et al., 2011).

2.5.2 Imobilização em sistema à baixa pressão

A imobilização de lipases, em especial a de *Candida antarctica* B, à pressão ambiente, segundo algumas pesquisas pode ser obtida por cromatografia com Sepharose, assim como em sílica e alumina (Arroyo et al., 1999), membrana cerâmica (Magman et al., 2004), resina acrílica (Dalla Vecchia et al., 2004), carvão ativado (Rodrigues et al., 2008), sílica coloidal (Cruz et al., 2009), quitosana e gelatina (Rangel et al., 2011), hidrogéis de quitosana (Silva et al., 2012a), além de suportes orgânicos, como a fibra de coco verde (Brigida et al., 2007; Brigida et al., 2008).

Poucos trabalhos reportam a imobilização da Lipase Amano PS, contudo dentre os publicados têm-se descritos os suportes como a matriz inorgânica (óxido de nióbio) e matriz híbrida (polissiloxano- álcool polivinílico) (Da Ros et al., 2010) e os de nanopartículas superparamagnéticas (Andrade et al., 2010).

Dentre a imobilização de lipases para aplicação em reações em meio orgânico, destaca-se o estudo realizado por Correia et al. (2011), os quais avaliaram 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: monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG).

Outros autores reportam a imobilização de lipases em PU, como Kloss (2007) que investigou o uso de lipases e poliuretanos em reações de transformação em monômeros/aligômero cíclico, na presença de solvente orgânico, assim como Pires-Cabral et al. (2007) que investigaram a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano hidrófilas ("HYPOL'FHP2002" e "HYPOL'FHP5000") para aplicação na síntese de butirato de etila, éster de sabor frutado, em n-hexano e Pramod e Lingappa (2008), que realizaram um estudo com lipase de *Aspergillus niger* imobilizada em espuma de poliuretano, para produção de ácido cítrico.

A imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* em espumas de poliuretano utilizando as técnicas de adsorção, ligação covalente e troca iônica para síntese de lauril laurato foi reportada no trabalho de Cui et al. (2013).

2.6 Considerações a respeito do estado da arte

O estudo da imobilização de enzimas tem sido amplamente avaliado visando aumentar a sua estabilidade para aplicação em processos industriais. Vários suportes são relatados, dentre estes o PHBV e o poliuretano. O polímero PHBV se apresenta como uma alternativa promissora devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. A utilização de espumas de poliuretano para imobilização de enzimas tem sido recentemente reportada com sucesso em trabalhos como o de Cui et al. (2013) e Silva et al. (2013) .

A utilização de fluidos supercríticos vem ganhando destaque, principalmente na área biotecnológica com resultados promissores, podendo estes ser empregados no tratamento de enzimas, visando aumentar sua atividade, e a sua eficiência. Cabe ressaltar que nos processos utilizando CO₂ supercrítico como antissolvente este fator é minimizado mediante a afinidade do solvente utilizado com o antissolvente, resultando em quantidades mínimas de solvente residual na amostra co-precipitada.

Outra vantagem sobre a técnica de imobilização de enzimas com fluidos supercríticos reside na possibilidade do controle de tamanho e distribuição de tamanho de partículas.

A utilização de fluidos supercríticos aliada a métodos convencionais de imobilização vem se tornando uma alternativa promissora. O tratamento de enzimas imobilizadas com fluidos supercríticos visando aumentar sua estabilidade já tem sido reportada na literatura por Oliveira et al. (2006), Kuhn et al. (2010), Kuhn et al. (2011), no tratamento de enzimas não comerciais com propano.

Portanto, a utilização de fluidos supercríticos aliado a técnicas convencionais de imobilização, bem como a utilização de PHBV e PU como suportes para imobilização de lipases, apresenta potencial de aplicação, tornando-se uma alternativa viável para aplicação em processos industriais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os equipamentos, materiais e as metodologias utilizadas para realização dos experimentos de imobilização das enzimas. A lipase Amano PS foi imobilizada em PHBV purificado utilizando sistema à alta pressão e a lipase CalB foi imobilizada em nanopartículas de PHBV e espumas de poliuretano em sistema à baixa pressão.

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram os seguintes:

- Agitador magnético (Fisatom, 650 W de potência);
- Agitador magnético (Velp Científica);
- Agitador orbital (Marconi MA-410);
- Agitador rotatório (Tecnal, TE-165);
- Balança analítica (Shimadzu);
- Banho ultratermostático (Nova ética, Modelo 512/2D);
- Bomba de HPLC Digital Série III (Acuflow);
- Bomba de alta pressão (Isco 500D);
- Bomba a vácuo (Tecnal- TE-058);
- Conexão tipo T (Swagelok);
- Controlador PID (COEL, Modelo HW1450);
- Difratorômetro de raio-X (Rigaku- Miniflex II, com tubo emissor de Cu-1,54);
- Espectrofotômetro Lambda 35, UV-Vis (Perkin Elmer);
- Estufa (Fanem, Modelo 320SE);
- Fita de aquecimento (FISATOM, Modelo 5, 200 W de potência);
- Fluorímetro (Invitrogen Qubit™);
- Freezer (Brastemp);
- Indicador de temperatura (Indicador Universal - NOVUS, Modelo N1500);
- Liquidificador (Walita);

- Membrana de politetrafluoretileno (Milipore, Modelo FGLP);
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV - QUANTA 200FEG);
- Micropipeta (Transferpette);
- Papel filtro (Whatman);
- *Peek Tubing* (Upchurch Scientific);
- pHmetro (Marconi, MA- 522);
- Refrigerador (Consul);
- Transdutor de pressão (Smar, Modelo LD 301);
- Válvulas de esfera (Swagelok, Modelo SS-83KS4);
- Válvula métrica tipo agulha (HIP, Modelo 15-11AF1);
- Válvula métrica tipo agulha (HOKE, Modelo 1315G2Y);
- Válvula de regulação de pressão (GO-Regulator, Serie BP-66, Modelo 1A11QEQ151);
 - Válvula de uma via (HIP, Modelo 15-41AF1-T).

3.1.2 Reagentes

Para os experimentos de imobilização foram utilizados os seguintes reagentes:

- Acetona (FMaia);
- Ácido oleico (Sigma Aldrich, pureza 99%);
- Ácido propiônico (Merck, pureza $\geq 99\%$);
- Álcool etílico (Merck);
- Álcool etílico (Vetec);
- Álcool isopropílico (Neon);
- Autosorb-1 da Quantachrome (Nova-2200e);
- Clorofórmio P.A. (Vetec, pureza de 99,5%);
- Diclorometano (FMaia, pureza de 99,5%);
- Dióxido de carbono (White Martins S.A., pureza de 99,8%);
- Geraniol (Sigma Aldrich, pureza $\geq 97\%$);
- Goma arábica (Próton);
- Heptano P.A. (Vetec, pureza de 99,5%);
- Hidróxido de sódio (Nuclear);

- Isocianato (Empresa Flexível Poliuretanos);
- Óleo de oliva (Carbonell);
- Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar (M_w) de 196.000 e índice de poli dispersão de 1,85 (PHB Industrial S/A);
- Peneira molecular 4 A (Sigma Aldrich);
- *p*-nitrofenol (Sigma Aldrich);
- *p*-nitrofenil butirato (Sigma Aldrich);
- Polioli (Empresa Flexível Poliuretanos).

Estes materiais foram utilizados como recebidos, sem qualquer tratamento prévio e foram armazenados de forma adequada, evitando assim, o contato com a luz, calor e umidade.

Os seguintes materiais foram utilizados para realização dos experimentos de imobilização das lipases

3.1.2.1 Enzimas

As enzimas utilizadas nesta pesquisa foram a lipase Amano de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) adquirida na forma pó da empresa Sigma Aldrich e a de *Candida antarctica* B (Novozymes NZL-102, CalB), adquirida na forma líquida da empresa Novozymes Latin América Ltda.

Cabe ressaltar que a enzima CalB líquida foi previamente diluída em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, na proporção 1:10 (enzima:tampão).

A enzima Amano PS foi empregada na avaliação do potencial de imobilização em PHBV à alta pressão. A enzima CalB foi empregada a fim de avaliar o potencial de imobilização em nanopartículas de PHBV e espumas de PU à pressão ambiente.

3.1.2.2 Suportes

Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato): o polímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) com massa molar (M_w) de 196.000 e índice de poli dispersão de 1,85 foi gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial S/A.

O polímero foi submetido a uma pré-purificação, pela sua dissolução em clorofórmio e posterior precipitação em n-heptano para retirada de impurezas. O

polímero PHBV bruto (Figura 4 a) e pré-purificado (Figura 4 b) podem ser observados na Figura 4.

Figura 4 – Aspecto do polímero PHBV bruto (a) e purificado (b).



(a)

(b)

Poliuretano: Os monômeros comerciais polioli e isocianato, utilizados nesse trabalho foram produzidos com uma formulação específica para colchões e espumas injetadas pela Empresa Flexível Poliuretanos - Mannes. O PU formado com os referidos monômeros resulta no PU do tipo flexível. A Figura 5 apresenta os monômeros utilizados para elaboração da espuma de PU.

Figura 5 – Apresentação dos monômeros usados na elaboração da espuma de PU, (a) polioli e (b) isocianato.



(a)

(b)

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação da solubilidade das enzimas e PHBV em solventes

A solubilidade das lipases Amano e CalB foram avaliadas em diclorometano e água, razão molar 1:10 (v/v), sob agitação a temperatura ambiente.

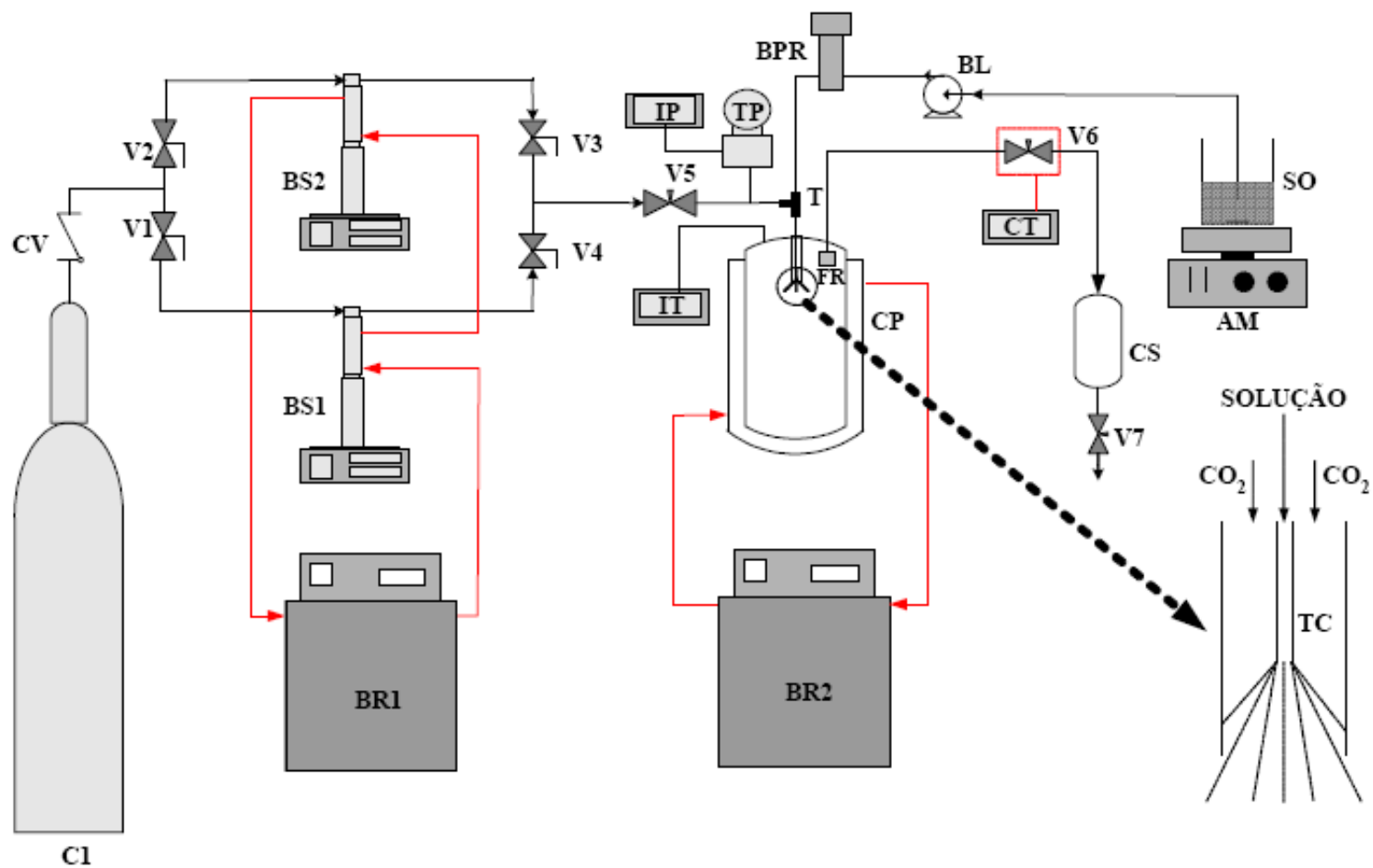
A escolha do diclorometano como solvente para solubilizar o polímero PHBV foi feita com base no trabalho de Franceschi (2009), que utilizou o sistema ternário CO₂ + diclorometano + PHBV, para identificar a solubilidade, onde o diclorometano foi selecionado para os experimentos de precipitação do polímero (PHBV) por ser um solvente compatível com o polímero e com alta afinidade pelo CO₂ (Corazza et al., 2003).

3.2.2 Imobilização a alta pressão

3.2.2.1 Aparato experimental utilizado para co-precipitação do lipase Amano PS no polímero PHBV

O aparato experimental utilizado para a co-precipitação da lipase Amano PS em PHBV em sistema à alta pressão é detalhado na Figura 6 (Franceschi et al., 2008; Franceschi et al., 2009). Cada item que compõe a unidade será devidamente descrito abaixo da Figura 6.

Figura 6 -Diagrama esquemático do aparato experimental de precipitação e co-precipitação.



C1 – Cilindro de CO₂. Armazenamento do fluido empregado como antissolvente nos experimentos de precipitação;

CV – Válvula de uma via (*Check-Valve* - Pressão de operação até 1034 bar). Este tipo de válvula permite o fluxo em um único sentido. É utilizada entre o cilindro e as válvulas V1 e V2 para impedir que uma sobrecarga de pressão seja aplicada na cabeça do cilindro de armazenamento;

V1, V2, V3 e V4 – Válvulas de Esfera (Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente). Quando abertas, as válvulas V1 e V2 permitem o fluxo de antissolvente para as bombas de alta pressão, e as válvulas V3 e V4 das bombas para a câmara de precipitação. O objetivo das válvulas V1 e V2 é separar as duas bombas, evitando que a pressão de trabalho em uma bomba interfira na pressão de trabalho da outra bomba, possibilitando que as mesmas operem independentemente. As válvulas V3 e V4 têm por função isolar a linha das bombas até a câmara de precipitação. Como se trabalha com uma bomba por vez, quando a válvula V3 está aberta, permitindo o fluxo de antissolvente de uma das bombas para a câmara, a válvula V4 está fechada e vice-versa;

BR1 – Banho Ultratermostático de Recirculação 1. Utilizado para manter a temperatura constante nos cilindros das bombas;

BS1 e BS2 – Bombas de Alta Pressão. Os experimentos de precipitação empregando antissolventes pressurizados são comumente realizados com fluxo contínuo e constante do antissolvente a pressão constante. É necessário então um equipamento que satisfaça estas condições. As bombas do tipo seringa se encaixam neste contexto, pois permitem que se opere a fluxo constante ou a pressão constante. No presente trabalho foram utilizadas duas bombas de seringa que possuem um cilindro com capacidade de 506 mL, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 mL.min⁻¹;

V5 – Válvula métrica tipo agulha (Pressão de operação até 1034 bar). O objetivo desta válvula é controlar o fluxo de antissolvente das bombas para a câmara de precipitação. Esta válvula permite uma abertura gradual possibilitando uma regulagem fina da vazão;

TP – Transdutor de Pressão. É conectado à linha entre a válvula V5 e a câmara de precipitação para monitorar a pressão no interior desta. Foi utilizado um

transdutor de pressão absoluto com faixa de operação de 0 – 250 bar para medida da pressão do sistema. De acordo com especificação de fábrica, a precisão do equipamento é de 0,125% da faixa operacional (0,31 bar);

IP – Indicador Universal. Os valores de pressão são coletados em um indicador universal que recebe um sinal digital do TP indicando a pressão na câmara de precipitação e na linha até a válvula V5;

AM – Agitador Magnético. O sistema de agitação tem como objetivo manter a solução orgânica sob agitação permanente durante a realização dos experimentos. Para tal foi inserido dentro do frasco que contém a solução uma barra magnética de agitação (“peixinho”). Este sistema de agitação facilita a passagem da solução;

SO – Solução Orgânica. Solução na qual o sólido a ser precipitado é dissolvido em um ou mais solventes orgânicos;

BL – Bomba de HPLC Digital Série III. Bomba utilizada para deslocar a solução orgânica para a câmara de precipitação. Este tipo de bomba possui um único pistão que permite operar com fluxo constante ($0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) tendo uma precisão de $\pm 0,2\%$ sobre toda a faixa de operação. A pressão de trabalho varia de 0 a 414 bar com precisão de $\pm 2\%$;

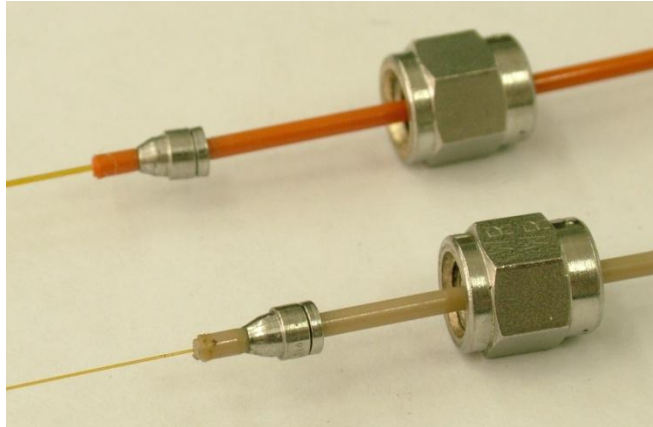
BPR – Válvula de regulação de Pressão (*Back Pressure Regulator*). Esta válvula permite que se realize a regulação da pressão desde a bomba de HPLC até ela independentemente da vazão, permitindo assim uma pressão maior anterior a ela e menor depois dela. É construída em aço inox 316L com uma porta de entrada e uma de saída. Segundo o fabricante, o controle de pressão é ajustável na faixa de 0 a 690 bar, com faixa de temperatura de operação entre -40 e 176°C . A pressão na porta de entrada que é regulada por esta válvula é monitorada no visor do painel da bomba de HPLC;

T – Conexão tipo T. União do tipo T, à qual estão conectadas a linha de antissolvente e a linha da solução. A linha da solução que vai da BPR até esta união é constituída por um tubo de polieterecetonato (*PEEK Tubing*), com diâmetro interno de 0,254 mm. Até esta união o antissolvente e a solução fluem por linhas separadas e a partir dela até a câmara de precipitação pertencem à mesma linha, porém a solução escoia por dentro do tubo capilar e o antissolvente escoia por fora do tubo capilar e por dentro do tubo de aço inox com diâmetro interno de 1,587 mm;

CP – Câmara de Precipitação. Foi utilizada uma câmara cilíndrica de aço inox 316 encamisada, com volume útil de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura de 12 cm). A pressão e temperatura máxima de trabalho são, respectivamente, 200 bar e 100 °C para a câmara. A câmara possui cinco entradas na tampa, uma central para a adição da solução orgânica e do antissolvente e quatro periféricas, três para a inserção do sensor de temperatura, sensor de pressão e saída do antissolvente e solvente orgânico e a quarta conexão periférica fica vedada para uma possível modificação do sistema de precipitação;

TC – Tubo Capilar de Sílica Fundida. A função deste tubo é fazer com que ocorra a dispersão do jato da solução dentro da câmara de precipitação. O tubo capilar é conectado ao *PEEK Tubing* em uma extremidade da união T, passando por dentro deste. A outra extremidade do tubo capilar é inserida na câmara de precipitação. O diâmetro interno do tubo capilar utilizado neste trabalho foi de 100 e 180 μm . Na Figura 7 pode ser visualizado o capilar conectado ao *PEEK Tubing*.

Figura 7 - Tubos capilares conectados aos *PEEK Tubing*.



IT – Indicador de Temperatura. É um conjunto composto por um sensor de temperatura (PT-100) e um indicador de temperatura usado para medir o valor real da temperatura no interior da câmara de precipitação;

BR2 – Sistema de Controle de Temperatura da Câmara de Precipitação. A câmara de precipitação possui uma camisa de aço inox 316, a qual está conectada a um banho ultratermostático de recirculação (BR2). O controle de temperatura é realizado por este banho onde há circulação de água do banho passando pela

câmara e desta retornando ao banho. Uma vista da câmara de precipitação conectada a todas as linhas é apresentada na Figura 8.

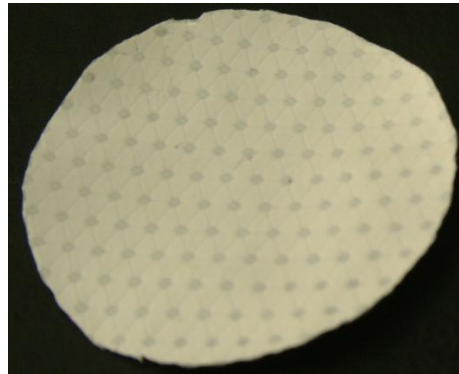
Figura 8 - Câmara de precipitação conectada a todas as linhas da unidade experimental utilizada na co-precipitação da lipase Amano PS em PHBV.



FR – Filtro de Retenção. O filtro de retenção é composto por dois filtros de politetrafluoretileno (PTFE), o primeiro com porosidade superficial de aproximadamente 1 μm , diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm que serve de base para o outro filtro membrana de politetrafluoretileno (Figura 9), conectado a um suporte de polietileno de alta densidade. Este filtro possui porosidade de 0,22 μm , espessura de 150 μm e mesmo diâmetro do primeiro filtro, permitindo temperatura de operação de até 130°C. Estes filtros estão dispostos na saída da câmara de precipitação com a finalidade de reter as partículas precipitadas na câmara de precipitação permitindo apenas o fluxo do antissolvente e do solvente orgânico. A escolha do filtro é muito importante dado que alguns tipos de filtros podem interagir com o solvente orgânico, dissolvendo-se neste e pondo em risco todo o processo de

retenção e coleta das partículas. Os filtros membrana politetrafluoretileno são hidrofóbicos e proveem uma ampla compatibilidade química com diferentes tipos de solventes orgânicos.

Figura 9 - Filtro membrana de politetrafluoretileno.



V6 e linha pontilhada – Válvula métrica tipo agulha (Pressão de operação até 345 bar) com sistema de aquecimento. A finalidade desta válvula é controlar o fluxo na saída da câmara de precipitação juntamente com a válvula V5. A válvula V6 possui uma abertura um pouco maior do que a válvula V5 para compensar o fluxo de entrada da solução, mantendo assim a pressão constante na câmara de precipitação. Qualquer pequeno aumento da pressão na câmara durante o experimento promove uma diminuição no fluxo do antissolvente, necessitando um controle rigoroso na abertura da válvula V6. Desta forma, quem comanda a variação do fluxo de antissolvente e a manutenção da pressão é esta válvula.

Como o antissolvente expande após esta válvula e conseqüentemente congela devido ao efeito Joule-Tomphson ser pronunciado, há a necessidade de um sistema de aquecimento para permitir a manutenção do fluxo constante. Para tal, foi utilizada uma fita de aquecimento acoplada a um controlador PID – CT. A válvula V6 é envolta pela fita de aquecimento, sendo um termopar tipo J inserido entre o corpo da válvula e a fita de aquecimento para servir como elemento de alimentação do controlador de temperatura. A manutenção de uma temperatura alta (geralmente 100°C) impede o congelamento da válvula V6 e permite um controle maior do fluxo nesta válvula.

CS – Câmara de Separação. Consiste de um cilindro de aço inox 316, com capacidade máxima de 45 mL. Possui porta de entrada na parte superior e porta de saída na parte inferior. Neste trabalho, esta câmara é colocada após a válvula V6 com o objetivo de deixar o antissolvente na sua pressão de vapor, diminuindo assim o congelamento da referida válvula. Esta câmara também pode ser utilizada como meio de separação do antissolvente e do solvente orgânico permitindo que estes possam ser reutilizados.

V7 – Válvula métrica tipo agulha (pressão de operação até 1034 bar). O objetivo desta válvula é manter o antissolvente na sua pressão de vapor dentro da câmara de separação.

Todas as válvulas, conexões e tubos foram utilizados seguindo as instruções do Manual Hip, Hoke e Swagelok. Na Figura 10 esta apresentada uma vista mais detalhada da câmara de precipitação utilizada neste trabalho.

Figura 10 - Vista detalhada da unidade experimental de utilizada na co-precipitação da lipase Amano PS em PHBV.



3.2.2.2 Procedimento experimental da co-precipitação da lipase Amano PS com polímero PHBV

A co-precipitação da lipase Amano PS com o polímero poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) purificado foi realizada com dióxido de carbono supercrítico como antissolvente e diclorometano como solvente orgânico utilizando a técnica de Dispersão da Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (SEDS) para imobilização. Os parâmetros investigados foram a concentração da enzima (0,75; 1,25 e 2,0 mg.mL⁻¹), concentração do polímero PHBV (5, 10, 15 e 20 mg.mL⁻¹) e diâmetro do capilar (100 e 180 µm). A enzima e ao suporte PHBV purificado foram adicionados 40 mL de diclorometano, sob agitação. Foram mantidas fixas a pressão do sistema (80 bar), a taxa de fluxo da solução foi 1,50 mL.min⁻¹, taxa de fluxo antissolvente 20 mL.min⁻¹, secagem do precipitado com 2000 mL de CO₂ e temperatura constante de 40 °C, para em aparato experimental apresentado e descrito no item 3.2.2.1 deste capítulo.

Este estudo foi realizado com base no trabalho de Franceschi (2009), onde vários ensaios foram realizados conforme apresentado na Tabela 2, avaliando-se a concentração da enzima e do polímero PHBV.

Tabela 2 – Condições experimentais da concentração de lipase Amano PS e do polímero PHBV avaliados no processo de imobilização em sistema à alta pressão.

Experimento	Concentração PHBV (mg.mL ⁻¹)	Concentração Amano PS (mg.mL ⁻¹)
1	10	0,75
2	10	1,25
3	10	2,00
4	15	2,00
5	20	2,00
6	5	2,00

De posse dos resultados obtidos na realização do primeiro planejamento experimental foi possível investigar uma nova faixa de concentração do PHBV, bem

como investigar a variação da pressão do sistema de imobilização à alta pressão. Nesta segunda etapa, foram mantidas fixas a concentração de lipase Amano PS (2 mg.mL⁻¹), temperatura (40 °C), vazão de CO₂ (20 mL.min⁻¹) e vazão da solução (1,50 mL.min⁻¹). A matriz do planejamento experimental realizado está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental 2² com os valores codificados e reais da concentração do polímero PHBV e da pressão no processo de imobilização em sistema à alta pressão.

Experimento	Concentração PHBV (mg.mL ⁻¹)	Pressão (bar)
1	-1 (10)	-1 (80)
2	+1 (20)	-1 (80)
3	-1 (10)	+1 (160)
4	+1 (20)	+1 (160)
5	0 (15)	0 (120)
6	0 (15)	0 (120)
7	0 (15)	0 (120)

Preparo das soluções: As soluções orgânicas contendo a lipase Amano PS foram preparadas utilizando diclorometano como solvente orgânico. As soluções contendo PHBV foram preparadas com base em testes de solubilidade do polímero em diclorometano a temperatura e pressão ambiente (Franceschi, 2009). Para cada experimento de co-precipitação da enzima Lipase Amano PS em polímero PHBV, uma nova solução era preparada no sentido de evitar que houvesse modificação na concentração da solução devido à evaporação do diclorometano durante o armazenamento, dado que este solvente é extremamente volátil. Após preparar a solução que seria utilizada no experimento seguinte, o próximo passo era carregar as bombas de alta pressão (BS1 e BS2) com CO₂ proveniente do cilindro de estocagem.

Carga de CO₂: Esta etapa de carga de CO₂ envolve alguns passos. A primeira delas é o deslocamento do fluido do cilindro para a câmara interna de cada

bomba. Para tal, as válvulas V1 a V4 eram mantidas abertas. Como uma quantidade relativamente grande de CO₂ é utilizada em cada condição experimental, 2000 mL dependendo da condição experimental, é necessário liquefazer a maior quantidade possível deste na câmara das bombas. Apesar da pressão de vapor do CO₂ ser alta a temperatura ambiente (aproximadamente 64 bar a 25 °C), a simples abertura da válvula do cilindro não era suficiente para deslocar a quantidade necessária de CO₂ para a câmara das bombas.

Sendo assim, a temperatura da camisa do cilindro das bombas era ajustada em 7°C com o auxílio do banho de recirculação BR1 e o cilindro era deixado aberto por um tempo variando de 30 minutos a 1 hora, dependendo da quantidade de CO₂ disponível no cilindro de estocagem. Nestas condições, geralmente era possível armazenar cerca de 490 mL de CO₂ no estado líquido dentro da câmara das bombas.

Montagem da câmara de precipitação: Durante este tempo de liquefação do CO₂ nas bombas, era realizada a montagem da câmara de precipitação. Os filtros de retenção eram cuidadosamente colocados na câmara para que ficassem firmemente postados, de forma a evitar que durante o experimento houvesse um deslocamento destes e posterior arraste do material precipitado pelo fluxo de saída. Primeiramente, era colocado o filtro de politetrafluoretileno com maior porosidade servindo de suporte para o filtro membrana que vinha logo a seguir. Posteriormente eram conectados o sensor de temperatura e a linha de saída da câmara de precipitação. Após isto, a câmara era fechada sendo então conectada ao banho termostático.

Conexão tubo capilar: Um aspecto importante que se deve ter muito cuidado é quanto à conexão do tubo capilar. O tubo capilar é preso ao *PEEK tubing* por um sistema de anilha e base de anilha de forma a propiciar uma boa vedação entre o capilar e este tubo. A união é feita inserindo-se uma das extremidades do capilar (cerca de 6,0 mm) para dentro do *PEEK tubing* e o sistema de anilhamento é então manipulado para que ocorra a fixação do capilar. Um aperto excessivo pode causar estrangulamento afetando o fluxo da solução. Porém, se não apertado o suficiente pode fazer com que o capilar solte do *PEEK tubing* ou até haja passagem de fluido entre a parede externa do capilar e a parede interna do tubo (Franceschi, 2009).

Ajuste da vazão: Durante a liquefação de CO₂ era realizado o ajuste da vazão da solução na bomba de HPLC e da pressão nesta através da manipulação da BPR. Nesta etapa não era utilizada solução, mas diclorometano puro para evitar gasto desnecessário da solução, já que eram utilizados cerca de 100 mL de líquido durante este procedimento. O ajuste da vazão da solução era feito diretamente na bomba. A pressão na bomba de HPLC era ajustada manipulando-se a BPR de modo a restringir a passagem do fluxo aumentando a pressão até o valor de 2900 psi (200 bar) para evitar qualquer possibilidade de refluxo do antissolvente pela linha da solução. Após a pressão ter sido alcançada, diclorometano era deixado fluir por um determinado tempo de modo a estabilizar a pressão.

Após a estabilização da pressão no valor desejado, a vazão era interrompida e diclorometano era substituído pela solução de maneira a retirar todo o diclorometano presente na linha desde a bomba até a saída do tubo capilar. A solução era permitida fluir por cerca de 10 minutos para minimizar a quantidade de diclorometano na linha. A pressão era mantida no valor desejado por intermédio da regulagem da BPR.

Conexão da linha de entrada e preenchimento da câmara de precipitação: Após estabilização da pressão era efetuada a conexão da linha de entrada de CO₂ e da solução na câmara de precipitação. Após todas as conexões terem sido feitas na câmara de precipitação, a válvula V5 era gradualmente aberta para permitir o enchimento da câmara com CO₂, mantendo-se ainda toda a linha aberta desde o cilindro de armazenagem até a câmara.

Estando a câmara de precipitação preenchida com CO₂ na sua pressão de vapor, a válvula V5 era fechada e o sistema de aquecimento, controlado pelo banho de recirculação BR2 era acionado. A temperatura no interior da câmara era então captada pelo sensor de temperatura e monitorada pelo indicador de temperatura (IT). Destaca-se que o sensor e o indicador de temperatura estavam previamente calibrados de modo que a temperatura real do sistema era sempre baseada no indicador (IT).

Estabilização da temperatura e pressurização das bombas: Durante o período de estabilização da temperatura no valor estipulado, a válvula do cilindro e as válvulas V1 a V4 eram fechadas e a pressão era elevada nas bombas de seringa

pelo deslocamento do cilindro interno destas, pressurizando toda a linha desde as válvulas V1 e V2 até a válvula V5 até a pressão de 200 bar entre as bombas e a câmara de precipitação. Este valor de pressão nas bombas de seringa foi estipulado para manter um alto diferencial de pressão entre as bombas e a câmara de precipitação (80 e 160 bar dependendo da pressão de experimento na câmara de precipitação). Este diferencial de pressão tem como objetivo evitar possível refluxo da câmara de precipitação para as linhas podendo causar precipitação de enzima ou polímero nas linhas e também para fazer com que o CO₂ entrasse com alta velocidade na câmara de precipitação intensificando a dispersão do jato de solução durante os experimentos de precipitação (Franceschi, 2009).

No momento em que a temperatura do experimento atingia o valor estipulado, a válvula V5 era novamente aberta gradualmente de modo a permitir o fluxo de CO₂ para dentro da câmara até a obtenção da pressão experimental desejada. Uma vez que a pressão na câmara atingisse o valor desejado, a válvula V6 era gradualmente aberta, mantendo-se a válvula V5 ainda aberta, no sentido de ajustar o fluxo de antissolvente na câmara de precipitação, mantendo-se a pressão constante. O fluxo era controlado principalmente pela válvula V6 e monitorado no visor da bomba de alta pressão que estava sendo utilizada no momento.

Controle da temperatura e pressão: Para evitar o congelamento da válvula V6, a mesma foi envolta por uma fita de aquecimento ligada ao controlador de temperatura (CT), tendo um termopar conectado a um controlador de temperatura. A temperatura foi mantida em 110 °C para evitar o bloqueio do fluxo neste ponto e, conseqüentemente, por em risco o andamento do experimento e a integridade física do experimentalista. Quando foram utilizadas pressões superiores a 120 bar, a temperatura foi aumentada para 150 °C, pois, neste caso, uma temperatura menor não impediria o congelamento da válvula V6.

Como auxílio, a válvula V7 também era aberta de tal maneira que a mistura de antissolvente e solvente orgânico que deixava a câmara de precipitação era mantida em duas fases dentro da câmara de separação (CS) evitando uma expansão muito pronunciada do antissolvente na linha.

A temperatura e pressão eram mantidas constantes e o CO₂ era deixado fluir até o alcance do estado estacionário. O tempo necessário para alcançar este estado

variou de 5 a 10 minutos dependendo da pressão e temperatura de precipitação. A partir do momento em que o fluxo de CO₂ não mais variava, era iniciada então a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação. Em cada experimento o volume de solução adicionado à câmara foi de exatamente 35 mL. O volume foi fixado neste valor assumindo que a quantidade de sólido (lipase ou polímero) a ser precipitado era suficiente para a realização das análises.

Secagem das partículas: Após ter sido injetado o volume especificado da solução, o fluxo desta era interrompido e o fluxo CO₂ (20 mL.min⁻¹) era mantido para passagem do volume de 2000 mL, no sentido de efetuar a “secagem” das partículas precipitadas no interior da câmara para retirar o solvente residual ainda presente no meio. O tempo de secagem estabelecido foi de 120 minutos, baseado em trabalhos na literatura que reportam tempos de secagem variando entre 30 e 120 minutos (Kim et al., 2007; Kang et al., 2008; Hong et al., 2009).

Um aspecto que merece maior detalhamento diz respeito ao modo com que as bombas de seringa eram operadas. Elas nunca foram utilizadas simultaneamente. Enquanto uma bomba estava sendo utilizada, a outra era carregada com CO₂ para garantir a disponibilidade de antissolvente durante todo o experimento.

Despressurização e coleta das amostras: Depois de proceder à secagem das partículas, o próximo passo era a despressurização da câmara de precipitação. Para a despressurização, a válvula V5 era fechada e a válvula V6 era mantida com uma abertura tal que permita uma despressurização controlada. Para reduzir a pressão experimental até a pressão atmosférica, o tempo utilizado foi de cerca de 40 minutos, promovendo uma queda de pressão nem muito rápida nem muito lenta de maneira a manter a temperatura constante no valor estipulado.

Terminada a despressurização, o banho BR2 era desconectado da câmara de precipitação, todas as linhas eram desconectadas e a câmara era então aberta para a retirada do material precipitado. Depois de aberta a câmara de precipitação, as partículas precipitadas eram retiradas e colocadas em frascos âmbar de 5 mL. A coleta do precipitado era feita cuidadosamente com o auxílio de um pincel para evitar que as partículas sofressem qualquer dano. A retirada era feita rapidamente para evitar ao máximo que as partículas absorvessem umidade. As amostras foram

coletadas na parede e no fundo da câmara de precipitação. As amostras coletadas foram armazenadas em geladeira devidamente vedadas para proteção contra luz e umidade.

A eficiência do processo de imobilização da lipase Amano PS em polímero PHBV em sistema à alta pressão foi avaliada pela dosagem da atividade hidrolítica segundo o item 3.2.6.1, sendo estas realizadas em duplicata de dosagem.

3.2.3 Imobilização a baixa pressão

A imobilização a baixa pressão consiste na realização do processo em aparato experimental mantido sob condições ambientais, ou seja, em pressão ambiente, considerada como baixa pressão em comparação com a metodologia de imobilização realizada em câmara a alta pressão.

3.2.3.1 Imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte

Precipitação do polímero PHBV para formação de nanopartículas

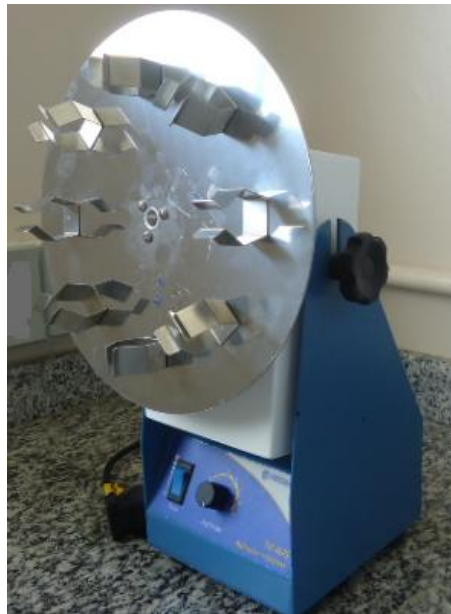
A precipitação do poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) purificado foi realizada utilizando dióxido de carbono supercrítico como antissolvente e diclorometano como solvente orgânico utilizando a técnica de Dispersão da Solução Melhorada por Fluidos Supercríticos (SEDS) para formação das nanopartículas, utilizando a metodologia descrita por Franceschi (2009). O polímero PHBV foi adicionado a 40 mL de diclorometano.

Dentre os parâmetros investigados, foram mantidos constante a concentração de PHBV (30 mg.mL^{-1}), pressão da solução orgânica (80 bar), a taxa de fluxo da solução de 1 mL.min^{-1} , taxa de fluxo antissolvente de 40 mL.min^{-1} e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, com capilar de $100 \text{ }\mu\text{m}$, com base no trabalho de Franceschi (2009). O aparato experimental utilizado nesta etapa do trabalho para a precipitação do PHBV purificado foi apresentado e descrito no item 3.2.2.1 deste capítulo e pode ser visualizado na Figura 6.

Processo de imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte

Em tubos de centrífuga de 50 mL, foram adicionados 0,1 g de nanopartículas de PHBV e 10 mL de solução enzimática da lipase CalB (atividade inicial 75 U.mL^{-1}). Os tubos foram mantidos sob agitação suave de 7 rpm (Silva et al., 2012) em agitador rotatório, apresentado na Figura 11.

Figura 11 - Agitador rotatório empregado na imobilização de enzimas utilizando PHBV como suporte.



Os parâmetros de imobilização, tempo de contato da enzima com as partículas de PHBV e o pH da solução enzimática, foram avaliados, buscando verificar a influência destes parâmetros no processo de imobilização da CalB utilizando PHBV como suporte.

O tempo de imobilização foi avaliado em 30, 60, 90, 120 e 150 min, em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, segundo metodologia proposta por Rodrigues et al. (2008).

A avaliação do efeito do pH na imobilização da enzima foi realizada utilizando-se o melhor tempo de imobilização (120 min) em diferentes tampões, na concentração de 25 mM, seguindo a faixa de pH estipulada para cada solução tampão, ou seja, acetato de sódio para pH 5; fosfato de sódio para os pHs 6, 7 e 8; tris aminometano para pH 9 e carbonato de sódio para pH 10.

Posteriormente, separou-se o suporte PHBV impregnado da enzima (imobilizado) da solução enzimática (sobrenadante) por filtração a vácuo, realizando-se lavagem com água destilada sob filtro do aparato conectado a bomba a vácuo. Após, o imobilizado foi mantido durante 24 horas em dessecador para equalização do teor de umidade.

Efetua-se a dosagem da atividade de hidrólise em *p*-nitrofenil butirato segundo metodologia descrita posteriormente (item 3.2.6.2), avaliando a eficiência da imobilização nas duas fases do processo de imobilização, (1) imobilizado e (2) sobrenadante/solução enzimática, fato este que impossibilitou a dosagem da atividade de esterificação em detrimento da amostra estar no estado líquido.

3.2.3.2 Imobilização da lipase CalB utilizando poliuretano como suporte

Polimerização dos monômeros

A reação de polimerização do poliuretano foi realizada variando a razão molar dos monômeros polioli:isocianato (5:2, 5:3, 5:4, 5:5 e 3:5 (v/v)), com base no trabalho realizado por Silva et al. (2013) modificado, conforme apresentado na Tabela 4.

A reação de polimerização foi conduzida com auxílio de uma seringa graduada pela qual os monômeros foram misturados e, posteriormente, homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro, durante 30 segundos. Após esta etapa ocorreu o estágio de polimerização (5 min) do poliuretano, expansão da espuma e completa solidificação (Silva et al., 2013, modificado).

Tabela 4 - Descrição das concentrações dos monômeros avaliadas para formação da espuma de PU.

Ensaio	Poliol (mL)	Isocianato (mL)
1	5	2
2	5	3
3	5	4
4	5	5
5	3	5

Imobilização da lipase CalB

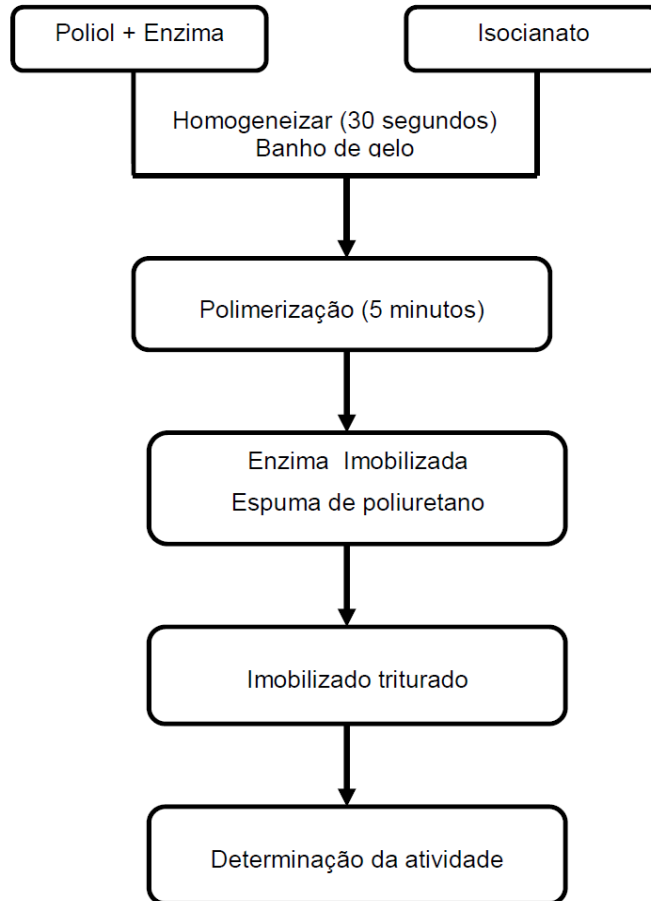
O procedimento experimental para imobilização da CalB em PU foi realizado empregando a concentração dos monômeros selecionada em etapa anterior (Tabela 4, ensaio 2) adicionado da enzima CalB diluída em diferentes solventes, (1) etanol, (2) acetona e (3) água, buscando avaliar a miscibilidade da enzima nos monômeros, para posterior estudo da imobilização e conseqüentemente formação do polímero.

A enzima, previamente solubilizada em água, álcool etílico ou acetona, razão molar 1:10 (v/v), foi adicionada ao polioliol. Após a etapa de homogeneização fez-se a adição do isocianato, procedeu-se a mistura por 30 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, para verificar qual solvente seria mais adequado.

A imobilização foi conduzida adicionando 10% do volume de *Candida antarctica B* diluída, aos monômeros. Para a imobilização, a enzima foi homogeneizada no monômero polioliol e após, ao isocianato, sendo o recipiente mantenedor da mistura envolto em banho de gelo, buscando evitar o aumento excessivo da temperatura devido à reação exotérmica gerada pela mistura dos monômeros, de acordo com o esquema apresentado na Figura 12.

Após a etapa de polimerização, o poliuretano contendo a enzima (imobilizado) foi mantido durante 24 horas em dessecador para equalização do teor de umidade.

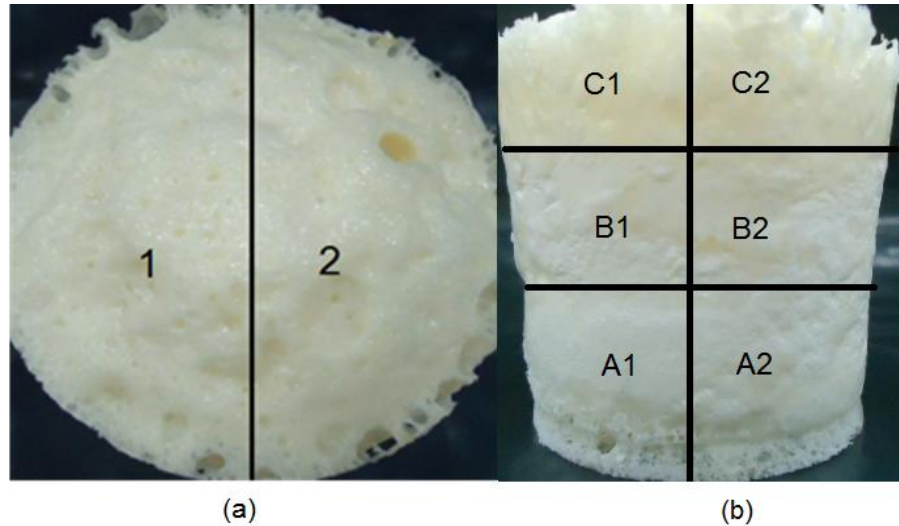
Figura 12 - Apresentação esquemática do procedimento de imobilização da lipase CalB em PU.



Descrição da Técnica de Amostragem da Enzima Imobilizada

Decorrida a polimerização, a estrutura formada com a enzima inclusa foi dividida em duas parcelas verticais (1 e 2) e três horizontais (A, B e C), como pode-se verificar na Figura 13 (a e b). Cada parcela foi identificada, pesada, triturada e submetida à medida de atividade de esterificação em ácido oléico e etanol, segundo metodologia a ser descrita no item 3.2.6.3. As frações foram testadas individualmente, para identificar a distribuição da lipase no processo de imobilização em todas as partes da espuma.

Figura 13 - Demonstração da metodologia de amostragem da espuma de PU formada com lipase CalB, considerando em (a) divisão em duas parcelas (1 e 2) na vertical vista superior do polímero e (b) divisão em três parcelas (A, B e C) na horizontal vista lateral.



A dosagem da atividade foi realizada em cada fração, em seguida todas as parcelas foram misturadas, onde verificou-se novamente a atividade segundo item 3.2.6.3, sendo este considerado o total do imobilizado (100%) e relacionando cada parcela em porcentagem de cada fração.

3.2.4 Avaliação da estabilidade da CalB imobilizada em sistema a baixa pressão

3.2.4.1 Estabilidade da enzima imobilizada à altas temperaturas

A CalB livre diluída e imobilizada em PHBV e PU foram mantidas em estufa a vácuo a 40, 60 e 80 °C durante 21 horas, segundo metodologia descrita por Silva et al. (2012a), modificada.

A dosagem da atividade da CalB livre e imobilizada em PHBV foi realizada segundo metodologia descrita no item 3.2.6.2 e a dosagem da atividade para CalB livre e imobilizada em PU conforme metodologia descrita no item 3.2.6.3.

3.2.4.2 Estabilidade da enzima imobilizada à baixas temperaturas

A CalB imobilizada em PHBV foi armazenada em geladeira (4 °C) em frascos de vidro (sem presença de tampão). Periodicamente, efetuava-se a dosagem da atividade hidrolítica em *p*-nitrofenil butirato, conforme metodologia descrita no item 3.2.6.2.

Para avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PU, a mesma foi fracionada e triturada em liquidificador, visando identificar se a forma do imobilizado influenciaria na atividade durante o armazenamento. Posteriormente, a CalB imobilizada em PU, fracionada e triturada, foi armazenada em geladeira (4 °C) em frascos de vidro (sem presença de tampão). A exposição à temperatura ambiente (25 °C) também foi avaliada para a CalB/PU fracionada e triturada. Periodicamente, efetuava-se a dosagem da atividade de esterificação com ácido oléico e álcool etílico, conforme metodologia descrita no item 3.2.6.3.

3.2.5 Avaliação da capacidade de ciclos operacionais da CalB imobilizada

3.2.5.1 CalB imobilizada em PHBV

Para avaliação do ciclo operacional foram adicionados 0,05 g da enzima CalB imobilizada em PHBV ao meio reacional (15 mM de *p*-nitrofenil butirato (pNFB) em 10 mL de álcool isopropílico e 100 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7) sob agitação a 28 °C, seguindo a mesma proporção dos reagentes, em volumes maiores, conforme metodologia descrita no item 3.2.6.2. A cada minuto, um volume de 2,5 mL era coletado para medida da atividade e posteriormente readicionado ao meio reacional, realizado em aparato experimental apresentado na Figura 14. Cada ciclo teve duração de 15 min. Após cada ciclo, o imobilizado era lavado com água destilada e a umidade equalizada em bomba a vácuo por 30 min.

Figura 14 – Aparato experimental utilizado para avaliação do reciclo reacional da CalB imobilizada em PHBV.



3.2.5.2 *CalB imobilizada em PU*

A síntese de ácido oléico e etanol foi avaliada para monitorar a atividade de esterificação da CalB imobilizada em PU durante os ciclos reacionais, com duração de 40 min. Após cada reciclo de reação (item 3.2.6.3), realizava-se a lavagem do imobilizado com 50 mL de etanol (95%) em filtro conectado a bomba a vácuo, durante 30 min.

3.2.6 Métodos de determinação de atividade enzimática

3.2.6.1 *Determinação da atividade hidrolítica – Método titulométrico*

Para a dosagem da atividade hidrolítica dos extratos enzimáticos lipolíticos utilizou-se inicialmente uma emulsão de óleo de oliva 5 % (m/v) e goma arábica 5% (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 18 mL desta emulsão são adicionados 2 mL da amostra do extrato bruto aquoso. Após incubação por 20 minutos a 35°C com agitação de 200 rpm, a reação era interrompida através da adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação eram então titulados até pH 11 com solução de NaOH 0,14 M. Os

brancos reacionais foram preparados adicionando-se 20 mL da emulsão óleo de oliva e goma arábica a solução de acetona-etanol. Para a dosagem da atividade de hidrólise da enzima imobilizada 0,1 g de amostra foram adicionadas ao meio reacional. A determinação da atividade hidrolítica foi realizada de acordo com a Equação 1. Uma unidade de atividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto nas condições de reação (Cavalcanti et al., 2005).

Para medir a atividade enzimática do solúvel foi efetuada a lavagem com 10 mL de água destilada e sob agitação por 20 min, após esse tempo a solução é então filtrada, e deixada secar por 30 min.

Devido ao baixo rendimento da reação de co-precipitação (imobilização), a determinação da atividade hidrolítica também foi realizada utilizando a concentração de 0,05 g de enzima, onde manteve-se a proporção dos reagentes, assim como as demais condições de reação.

$$AH = \frac{(Va - Vb)}{T Vc} M 1000 \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo:

AH: atividade hidrolítica (U.mL⁻¹ ou U.g⁻¹);

Va: volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após a reação (mL);

Vb: volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero - branco (mL);

M: molaridade da solução de NaOH (mmol.mL⁻¹);

T: tempo de reação (min);

Vc: volume do extrato enzimático usado na reação (mL).

3.2.6.2 Determinação da atividade hidrolítica - Método espectrofotométrico

O produto de hidrólise era o *p*-nitrofenol (pNP). Portanto, para se determinar a concentração do produto formado, construiu-se uma curva de calibração, representada no Anexo A. O meio reacional consistia de 15 mM de *p*-nitrofenil

butirato (pNFB) em 10 mL de álcool isopropílico e 100 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, sob agitação a 28 °C. Adicionava-se 2,5 mL deste substrato em cubeta onde se acrescia 0,1 mL de solução de enzima livre. Para dosagem da atividade do imobilizado, foram adicionados 0,0050 g de enzima imobilizada em 2,5 mL do substrato. Posteriormente, foi efetuada a medida da atividade hidrolítica, em espectrofotômetro a 348 nm (Brigida et al., 2008). O cálculo da atividade enzimática livre, carga oferecida e enzima imobilizada foram calculados utilizando as Equações 2, 3 e 4.

$$At = \frac{(\alpha - \alpha \text{ Branco}).D.f.c.Vr}{Ve} \quad \text{Equação (2)}$$

$$C_o = \frac{At \text{ livre}}{m_s} V_s \quad \text{Equação (3)}$$

$$At = \frac{(\alpha - \alpha \text{ Branco}).Vt.fc}{m_d} \quad \text{Equação (4)}$$

Sendo:

A_t : atividade enzimática livre e imobilizada ($U \cdot mL^{-1}$ ou $U \cdot g^{-1}$);

α : (slope solução enzima (livre/remanescente/imobilizado)-slope branco) ($abs \cdot min^{-1}$);

C_o : carga oferecida;

D : diluição da amostra;

F_c : fator da curva de calibração do pNP;

m_d : a massa do imobilizado (g);

m_s : massa do suporte (g);

V_r : volume reacional (mL);

V_t : volume reacional (mL);

V_e : volume da solução de enzima (mL).

3.2.6.3 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação das lipases nas diferentes formas de apresentação foi quantificada através da reação de síntese do ácido oléico e etanol (razão molar 1:1 (v/v)). A reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm por 40 min. Esta foi

iniciada pela adição da enzima (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início da reação. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido oléico (Ferraz et al., 2012 modificada).

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com 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 5.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) M 1000 V_f}{t M_{EL} V_c} \quad \text{Equação (5)}$$

Sendo:

AE : atividade de esterificação ($U \cdot g^{-1}$);

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

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

M : molaridade da solução de NaOH;

V_f : volume final de meio reacional (mL);

t : tempo (min);

M_{EL} : massa da preparação enzimática liofilizada utilizada na reação (g);

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

3.2.7 Determinação do teor de proteína

A quantificação do teor de proteína foi efetuada pelo método do Fluorímetro (Invitrogen Qubit™). O procedimento de leitura do teor de proteína é padrão onde o equipamento é acompanhado de uma solução tampão de proteína, solução para tampão, solução padrão 1, solução padrão 2 e solução padrão 3.

Inicialmente é preparada a solução tampão com 25 µL da solução para tampão e 4,975 µL do tampão de proteína. Os padrões 1, 2 e 3 são feitos com: 190 µL da solução tampão e 10 µL da solução padrão 1, 190 µL de solução tampão mais 10 µL da solução padrão 2 e 190 µL de solução tampão com 10 µL de solução

padrão 3, respectivamente. Em relação às amostras, 2 mg.mL⁻¹ de lipase livre foram diluídas em 10 mL de diclorometano e 0,010 g de enzima imobilizada foram utilizados sendo diluídas em 10 mL de diclorometano. O preparo da amostra para leitura é feito utilizando 190 µL da solução tampão mais 10 µL da amostra de enzima macerada ou diluída, neste caso a enzima foi dissolvida em diclorometano. Para leitura do teor de proteína, primeiramente é feita a calibração do equipamento pela inserção dos padrões 1, 2 e 3 respectivamente e após é efetuada a leitura do teor de proteína da amostra de enzima livre e enzima imobilizada previamente preparadas (Coghetto et al., 2012).

3.2.8 Cálculo dos parâmetros de imobilização

Durante os estudos de imobilização, além de acompanhar a atividade do imobilizado, o cálculo de dois parâmetros (atividade recuperada e rendimento imobilização) são fundamentais para avaliar a eficiência de imobilização. O percentual de enzima não imobilizada, rendimento de imobilização, atividade teórica e atividade recuperada foram calculados (Brigida et al., 2008), respectivamente, a partir das Equações 6, 7, 8 e 9.

$$NI = \frac{At_r}{At_i} 100 \quad \text{Equação (6)}$$

$$RI = \frac{At_i - At_r}{At_i} \quad \text{Equação (7)}$$

$$At_t = RI C_o \quad \text{Equação (8)}$$

$$A_r = \frac{At_i}{At_t} 100 \quad \text{Equação (9)}$$

Sendo:

At_i: atividade inicial (U. mL⁻¹);

A_r: atividade recuperada (%);

At_r: atividade remanescente (U. mL⁻¹);

A_t : atividade teórica ($U.g^{-1}$);

C_o : carga oferecida ($U.g^{-1}$);

NI: percentual de enzima não imobilizada (%);

RI: rendimento imobilizado (%).

3.2.9 Caracterização estrutural do polímero e enzima imobilizada

3.2.9.1 Isotermas de Adsorção em Nitrogênio (BET)

A caracterização da textura dos suportes PHBV foi realizada utilizando um Autosorb-1 da Quantachrome (Nova-2200e). Antes da análise, cerca de 100 mg das amostras (suportes) foram tratadas a vácuo, a uma temperatura de 300 °C por 3 horas. As medidas foram realizadas na temperatura do N₂ líquido.

3.2.9.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Visando inspecionar a morfologia das nanopartículas de PHBV e da CalB imobilizada em PHBV, foram obtidas micrografias a partir de um microscópio eletrônico de varredura (MEV), JEOL - JSM 5800 com voltagem de aceleração de 20KV e ampliações de 200x, 1.000x e 10.000x. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da UFRN.

3.2.9.3 Difração de Raio-X

Os difratogramas das amostras de nanopartículas PHBV, espumas de poliuretano, enzima CalB imobilizada em PHBV e PU foram obtidas através de um difratômetro de raio-X da marca Rigaku, Miniflex II, com tubo emissor de Cu-1,54, para a observação dos picos indicativos de cristalinidade. As análises foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Analítica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI-Erechim.

3.2.10 Avaliação da aplicação de lipases na catálise de reações de interesse

3.2.10.1 Esterificação enzimática de geraniol e ácido oléico

A esterificação enzimática foi realizada conforme condições otimizadas em trabalho anterior (Paroul et al., 2011), onde misturou-se álcool geraniol e ácido oléico na proporção molar de 3:1. Os substratos foram adicionados em Erlenmeyers de 50 mL com volume médio reacional de 5 mL. Foram adicionados ao meio reacional 10 esferas de peneira molecular. Pesou-se 0,5 g (10% (p/p)) em relação aos substratos) da enzima CalB imobilizada em PHBV e PU, onde o tempo reacional foi contado a partir da adição da enzima. Todos os experimentos foram realizados em agitador orbital com agitação constante de 160 rpm e temperatura de 40 °C. Após o término do tempo de reação que foi fixado em 6 horas, o biocatalisador foi filtrado com papel filtro. A quantificação da conversão em ésteres foi realizada por titulação com NaOH 0,05 M até pH 11. A determinação do rendimento da síntese do geranil oleato foi determinada segundo item 3.2.10.4).

3.2.10.2 Esterificação enzimática de geraniol e ácido propiônico

A esterificação enzimática foi realizada conforme condições otimizadas em trabalho anterior (Paroul et al., 2010), onde misturou-se álcool geraniol e ácido propiônico na proporção molar de 3:1. Os substratos foram adicionados em Erlenmeyers de 50 mL com volume médio reacional de 5 mL. Foram adicionados ao meio reacional 10 esferas de peneira molecular. Pesou-se 0,5 g (10% (p/p)) em relação aos substratos) da enzima CalB imobilizada em PHBV e PU, onde o tempo reacional foi contado a partir da adição da enzima. Todos os experimentos foram realizados em agitador orbital com agitação constante de 160 rpm e temperatura de 40 °C. Após o término do tempo de reação que foi fixado em 6 horas, o biocatalisador foi filtrado com papel filtro. A quantificação da conversão em ésteres foi realizada por titulação com NaOH 0,05 M até pH 9. A determinação do rendimento da síntese do geranil propionato foi determinada segundo item 3.2.10.4.

3.2.10.3 Esterificação Enzimática de ácido oléico e etanol

A avaliação da capacidade de reação da CalB imobilizada em PHBV e PU na reação de síntese do oleato de etila foi realizada através da reação do ácido oléico e etanol (razão molar (1:1) descrita por Ferraz et al. (2012) modificado. 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) (Paroul, 2011). A determinação do rendimento da síntese de oleato de etila foi determinada segundo item 3.2.10.4.

3.2.10.4 Determinação do rendimento das reações de síntese

A determinação do rendimento foi realizada segundo Paroul (2011), conforme mostram as Equações 10, 11, 12 e 13.

$$Q_a = v C \quad \text{Equação (10)}$$

$$A_r = \frac{1 \text{ mol ácido } m}{MM} \quad \text{Equação (11)}$$

$$M_a = \frac{Q_a v_t}{v_a} \quad \text{Equação (12)}$$

$$R = 100 - \frac{M_a 100}{A_r} \quad \text{Equação (13)}$$

Sendo:

A_r : ácido que reagiu (mol);

C : concentração de NaOH (mol.L⁻¹);

m : massa de ácido (g);

M_a : mols de ácido oléico (mol);

MM : massa molar (g.mol⁻¹);

Q_a : quantidade de ácido (mol);

R : rendimento de conversão (%);

v : volume gasto de NaOH (L);

v_t : volume total (mL);

v_a : volume de amostra (mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa, referentes à imobilização da lipase Amano PS em PHBV em sistema à alta pressão e imobilização da CalB em PHBV e PU a baixa pressão. A influência da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada, capacidade de ciclos reacionais e características dos suportes e dos imobilizados serão apresentados. Também serão verificadas as possibilidades de aplicação dos imobilizados em reações de síntese do geranyl propionato, geranyl oleato e oleato de etila.

4.1 Avaliação da solubilidade das lipases

A solubilidade da lipase Amano PS foi avaliada em diclorometano e água. Devido ao fato do polímero PHBV ser solúvel em diclorometano, a verificação da solubilidade neste solvente é de suma importância para realização da etapa do trabalho de imobilização a alta pressão, para assim ser possível solubilizar a enzima para formação das nanopartículas.

A consecução desta etapa permitiu verificar que a lipase Amano PS apresentava solubilidade parcial em diclorometano e a lipase CalB apresentava completa imiscibilidade neste solvente (aspecto água/óleo). A lipase CalB apresentava-se em estado líquido, não sendo possível solubilizá-la em diclorometano, sendo esta totalmente solúvel em água.

Portanto, a imobilização a alta pressão com a enzima CalB diluída em água se torna inviável. Tendo como base estes aspectos, a utilização da técnica SEDS para co-precipitação com o PHBV à alta pressão foi realizada apenas para imobilização da lipase Amano PS solubilizada em diclorometano.

4.2 Avaliação da imobilização a alta pressão

4.2.1 Imobilização lipase Amano em PHBV

Foram realizados experimentos buscando estabelecer a concentração adequada de enzima a ser empregada nos experimentos de co-precipitação. Foi utilizada a enzima lipase Amano de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) nesta etapa da pesquisa. A imobilização da lipase Amano PS foi realizada variando dois parâmetros experimentais: concentração de polímero PHBV e concentração de enzima, seguindo as condições dos ensaios descritos na Tabela 5 onde apresenta-se o planejamento experimental 2² (descrito na Tabela 2). Foram mantidas fixas as variáveis: pressão (80 bar), temperatura (40 °C), vazão da solução orgânica (1,50 mL.min⁻¹) e a vazão do dióxido de carbono (20 mL.min⁻¹) para a câmara de precipitação. A dosagem da atividade de hidrólise foi realizada segundo item 3.2.6.1.

Tabela 5- Atividades hidrolíticas obtidas nas condições experimentais para imobilização da lipase Amano PS em PHBV à alta pressão.

Experimento	Concentração PHBV (mg.mL ⁻¹)	Concentração Amano PS (mg.mL ⁻¹)	Atividade Hidrolítica inicial (U.g ⁻¹)	Atividade Hidrolítica imobilizado (U.g ⁻¹)
1*	10	0,75	—	—
2*	10	1,25	—	—
3	10	2,0	501,10	186,00
4	15	2,0	501,10	202,20
5	20	2,0	367,70	115,30
6*	5,0	2,0	—	—

* Nos experimentos 1, 2 e 6, não foi realizada a dosagem da atividade hidrolítica pois o rendimento em peso do imobilizado foi abaixo (0,05 g) do necessário para realização da reação de hidrólise.

Os resultados obtidos indicaram que a concentração de 2 mg.mL⁻¹ de enzima e 15 mg.mL⁻¹, ensaio experimental 4, resultou na maior atividade hidrolítica do imobilizado. Levando-se em conta que a lipase Amano PS apresentou-se totalmente

solúvel em diclorometano, concentrações maiores de enzimas ocasionariam a sua precipitação. Observou-se que as menores concentrações de PHBV resultaram em baixo rendimento do imobilizado. Cabe ressaltar que também foram realizados testes utilizando 25 mg.mL^{-1} de polímero PHBV e 2 mg.mL^{-1} de lipase Amano PS. Nesta concentração ocorreu entupimento da bomba de HPLC bem como no capilar, indicando que concentrações elevadas de enzima impossibilitam o funcionamento do sistema, possivelmente em virtude da sua parcial solubilidade em diclorometano, permitindo que partículas insolúveis fiquem aderidas na tubulação até obstruir o sistema à alta pressão. As nanopartículas formadas pela co-precipitação podem visualizadas na Figura 15.

Figura 15 - Fotos da câmara de precipitação referentes as nanoparticulas formadas durante os experimentos de imobilização (a, b e c).



(a)



(b)



(c)

Com base nestes resultados foi realizado um novo planejamento, resultando em 7 experimentos, onde variou-se a concentração do polímero PHBV e a pressão de co-precipitação (Tabela 3). Além da medida da atividade enzimática o teor de proteína também foi avaliado, onde os resultados obtidos neste planejamento podem se observados na Tabela 6. A dosagem da atividade de hidrólise foi realizada segundo item 3.2.6.1.

Tabela 6 – Avaliação da influência da concentração de polímero PHBV e pressão na análise da atividade da lipase Amano PS através da realização do planejamento experimental completo 2^2 .

Experimento	Concentração PHBV (mg.mL^{-1})	Pressão (bar)	Atividade Hidrolítica (U.g^{-1})		Atividade enzimática do solúvel (U.mL^{-1})*	Teor de proteína do imobilizado (mg.mL^{-1})
			Inicial	Final		
1	-1 (10)	-1 (80)	217,50	30,40	0,00	-
2	+1 (20)	-1 (80)	-	-	-	0,0021
3	-1 (10)	+1 (160)	168,30	157,80	0,20	-
4	+1 (20)	+1 (160)	118,80	55,90	0,00	0,0017
5	0 (15)	0 (120)	223,80	4,80	4,10	0,0011
6	0 (15)	0 (120)	-	-	-	-
7	0 (15)	0 (120)	-	-	-	-

*Atividade enzimática do solúvel consiste na dosagem da atividade hidrolítica do líquido obtido da lavagem do imobilizado, retirando enzimas não aderidas ao suporte.

A capacidade de imobilização da lipase Amano PS no sistema à alta pressão nas condições realizadas nesta etapa da pesquisa foi avaliada pelos resultados obtidos na solução de lavagem do imobilizado em relação ao imobilizado lavado. Na Tabela 6 pode-se observar que as atividades enzimáticas do solúvel foram baixas e ou nulas, indicando que ocorreu a imobilização da enzima no polímero PHBV.

Nos experimentos 6 e 7, descritos na Tabela 6, não foram realizadas dosagem da atividade enzimática e do teor de proteína, devido ao baixo rendimento da enzima imobilizada, bem como devido a problemas no aparato experimental.

A partir destes resultados pode-se observar que atividade da enzima imobilizada foi maior na pressão de 160 bar, (ensaio 3, Tabela 6) contudo o teor de proteína não foi quantificado devido ao baixo rendimento de amostra imobilizada.

A concentração inicial de enzima livre é 2 mg.mL^{-1} , o que corresponde a um teor de proteína inicial de $0,012 \text{ mg.mL}^{-1}$. O teor de proteína da condição experimental 2 corresponde a 17,5 % do valor inicial, a condição experimental 4 a 14,16% e na condição experimental 5 a 9,16% do valor inicial. Nas demais condições a medida do teor de proteína não pôde ser efetuada.

Este comportamento também foi relatado por Kuhn et al. (2010), onde lipases não comerciais de *Penicillium simplicissimum* e *Aspergillus parasiticus* na forma liofilizada e imobilizada foram submetidas ao tratamento com propano. Verificou-se a grande variação da atividade enzimática nos ensaios onde as enzimas foram tratadas com propano.

Devido ao baixo rendimento obtido neste processo de imobilização da lipase Amano em PHBV, optou-se em utilizar o suporte PHBV tratado a alta pressão para imobilização da lipase CalB líquida, utilizando a técnica de adsorção à baixa pressão. Considerando que as nanopartículas formadas através da precipitação com dióxido de carbono supercrítico fornecem partículas bastante uniformes, esta investigação torna-se interessante.

A imobilização da lipase Amano PS a baixa pressão não foi realizada, devido ao fato desta enzima ser insolúvel em água, impossibilitando sua comparação ao sistema de imobilização da CalB líquida.

4.3 Avaliação da imobilização a baixa pressão

4.3.1 Imobilização da CalB em PHBV

Considerando que a enzima CalB apresenta-se na forma líquida, a imobilização desta em nanopartículas de PHBV através do método de adsorção se torna uma alternativa viável. Portanto, o polímero PHBV purificado foi precipitado utilizando a técnica de alta pressão (conforme apresenta o item 3.2.2.1), para formação das nanopartículas. A Figura 16 apresenta as nanopartículas de PHBV precipitadas em CO₂.

Figura 16 - Aspecto do PHBV precipitado com CO₂ em sistema à alta pressão.



O PHBV é um polímero biocompatível e biodegradável, apresentando boa eficiência de encapsulamento do β -caroteno de acordo com descrito em Franceschi (2009), ressaltando ser um suporte livre de solvente após a precipitação, considerando a alta afinidade do solvente diclorometano pelo antissolvente CO₂, resultando em valores mínimos de diclorometano residual no biopolímero (Kang et al., 2008).

O estudo do tempo de imobilização da lipase *Candida antarctica* B diluída em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7 em nanopartículas de PHBV indicou o período de contato entre a enzima e o suporte necessário para que houvesse um bom fator de imobilização, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 7, considerando atividade inicial da solução enzimática diluída em tampão de 75 U.mL⁻¹.

Tabela 7 - Resultados obtidos na imobilização da CalB em PHBV em sistema à baixa pressão considerando diferentes tempos de contatos da solução enzimática com o suporte avaliado pela atividade de hidrólise do *p*-nitrofenil butirato da enzima livre e imobilizada em cada condição experimental.

Condição Experimental	Tempo Imobilização (min)	Carga oferecida (U.g ⁻¹)	Atividade inicial (U.mL ⁻¹)	Atividade de referência (U.mL ⁻¹)	Atividade remanescente (U.mL ⁻¹)	Enzima não imobilizada (%)	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade teórica (U.g ⁻¹)	Atividade do imobilizado (U.g ⁻¹)	Atividade recuperada (%)
1	30	83,87	86,81	86,81	5,78	6,66	93,34	78,25	0,11	0,14
2	60	73,76	75,23	98,38	4,63	6,15	93,84	69,22	0,09	0,42
3	90	51,41	52,08	75,23	5,78	11,09	88,90	45,24	0,10	0,23
4	120	51,67	52,08	75,23	5,78	11,09	88,90	45,93	0,33	0,72
5	150	63,05	64,82	53,24	4,63	7,14	92,85	58,51	0,13	0,22

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 7, ensaio 1 e 2) verificou-se que nos tempos de 30 e 60 min obteve-se a atividade do imobilizado de 0,11 e 0,09 U.g⁻¹, respectivamente. No tempo de contato de 120 min (ensaio 4) obteve-se a maior atividade do imobilizado (0,33 U.g⁻¹), sendo que o rendimento foi de 88,90% e atividade recuperada de 0,72%, maior recuperação se comparado com os demais tempos de contato para imobilização da CalB em PHBV.

Resultados similares foram obtidos por Brigida (2006), onde a atividade hidrolítica da CalB solúvel imobilizada em fibra de coco verde permaneceu inalterada após 120 min a pH 7.

A avaliação do pH de imobilização foi realizado buscando verificar o que resultasse em uma maior eficiência do processo de imobilização, sendo assim, a imobilização foi conduzida com tempo de contato de 120 min (selecionado na etapa anterior) do PHBV com a solução enzimática elaborada em diferentes pHs, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados obtidos na imobilização da CalB em PHBV em sistema à baixa pressão considerando diferentes pHs de contatos da solução enzimática com o suporte avaliado pela atividade de hidrólise do *p*-nitrofenil butirato da enzima livre e imobilizada em cada condição experimental.

Condição Experimental	pHs	Carga oferecida (U.g ⁻¹)	Atividade inicial (U.mL ⁻¹)	Atividade de referência (U.mL ⁻¹)	Atividade do remanescente (U.mL ⁻¹)	Enzima não imobilizada (%)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade teórica (U.g ⁻¹)	Atividade do imobilizado (U.g ⁻¹)	Atividade recuperada (%)
1	5	62,08	64,82	53,24	6,94	10,70	89,30	55,43	0,35	0,63
2	6	42,04	43,98	43,98	8,10	18,41	81,58	34,3	0,35	1,02
3	7	51,67	52,08	75,23	5,78	11,09	88,90	45,93	0,33	0,72
4	8	60,63	64,82	76,39	5,78	8,93	91,07	5,21	0,14	0,26
5	9	64,98	67,13	55,56	8,10	12,06	88,00	57,18	0,06	0,11
6	10	53,73	55,56	61,34	19,67	35,40	64,46	34,70	0,15	0,44

Os resultados obtidos com a imobilização em pH 5 (tampão acetato de sódio 25 mM) e pH 6 (tampão fosfato de sódio 25 mM) (Tabela 7, ensaios 1 e 2) apresentaram a maior atividade do imobilizado ($0,35 \text{ U.g}^{-1}$), seguindo do pH 7, ensaio 3 (tampão fosfato de sódio 25 mM) ($0,33 \text{ U.g}^{-1}$) e um rendimento de imobilização (88,90%). Os menores valores de atividade do imobilizado foram verificado em pHs 8 (tampão fosfato de sódio 25 mM), 9 (tampão tris aminometano 25 mM) e 10 (tampão carbonato de sódio 25mM). Levando em consideração que o ponto isoelétrico da lipase CalB é o pH 6, os resultados obtidos neste estudo indicaram uma faixa de pH ótimo próxima do ponto isoelétrico da enzima (Uppenberg et al., 1994; Rodrigues et al., 2008; Sun et al., 2010; Liu et al., 2011).

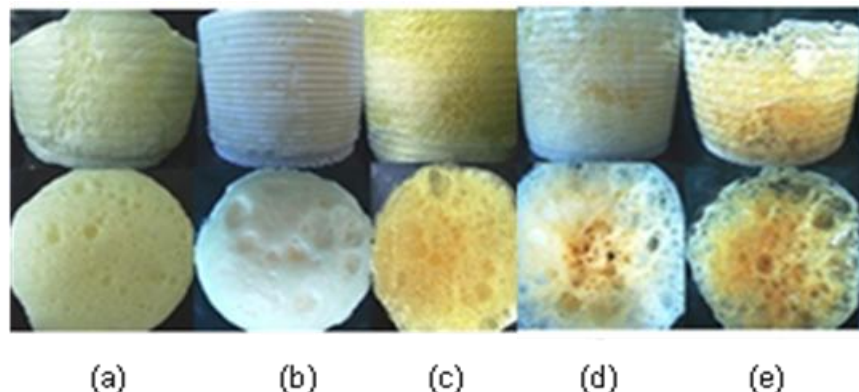
4.3.2 Imobilização da CalB em PU

4.3.2.1 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, 2003).

A Figura 17 apresenta o aspecto conformacional das espumas de PU sintetizadas, empregando as diferentes proporções de polioliol e isocianato.

Figura 17 - Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros polioliol e isocianato, respectivamente, sendo (a) 5 e 2 mL, (b) 5 e 3 mL, (c) 5 e 4 mL (d) 5 e 5 mL e (e) 3 e 5 mL.



As diferentes razões polioli:isocianato testadas apresentaram comportamentos distintos. Na razão molar 5:2 a espuma não polimerizou, 5:3 obteve-se uma espuma uniforme flexível, a razão de 5:4 conduziu à formação de uma espuma com grandes poros, 5:5 a espuma ficou oca e na razão 3:5 a espuma permaneceu úmida ao final do processo.

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 et al., 2008).

Após a avaliação das espumas obtidas, foi definida a proporção de polioli:isocianato (5:3 (v/v)), pois esta conduziu à formação de polímero com melhores características e, portanto, esta foi a proporção empregada na avaliação da imobilização da CalB.

4.3.2.2 Avaliação da conformação do imobilizado com lipase CalB solúvel

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, uma fase inferior 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 à formação de espumas com estruturas poliméricas homogêneas, com boa maleabilidade e distribuição dos poros. No entanto, destes, somente o PU incorporado com a enzima previamente diluída em água apresentou atividade enzimática.

A avaliação das condições de imobilização permitiu identificar que na razão 5:3 (v/v) de polioli/isocianato, ocorreu a formação de uma espuma mais flexível com poros uniformes. A quantidade de enzima previamente diluída em tampão, 10% (v/v), foi previamente adicionada ao monômero polioli. 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, o que indica que ocorreu imobilização da enzima, conforme mostra a Figura 18.

Figura 18- Vista frontal da amostra de espuma de poliuretano inteira (a) e vista frontal da espuma de poliuretano cortada ao meio (b).



(a)



(b)

Após a etapa de imobilização, o PU incorporado com enzima, foi seccionado em 3 partes (inferior, meio e superior), as quais, individualmente, foram submetidas a ensaios de atividade enzimática. A medida da atividade foi efetuada 24 h após a imobilização, momento em que a amostra apresentava-se seca. Cada fração foi triturada (Figura 19) e a medida da atividade efetuada, constatando-se que houve

atividade em todas as frações. Posteriormente, as frações de enzima imobilizada foram misturadas.

Figura 19- Aspecto da CalB imobilizada em PHBV, triturada.



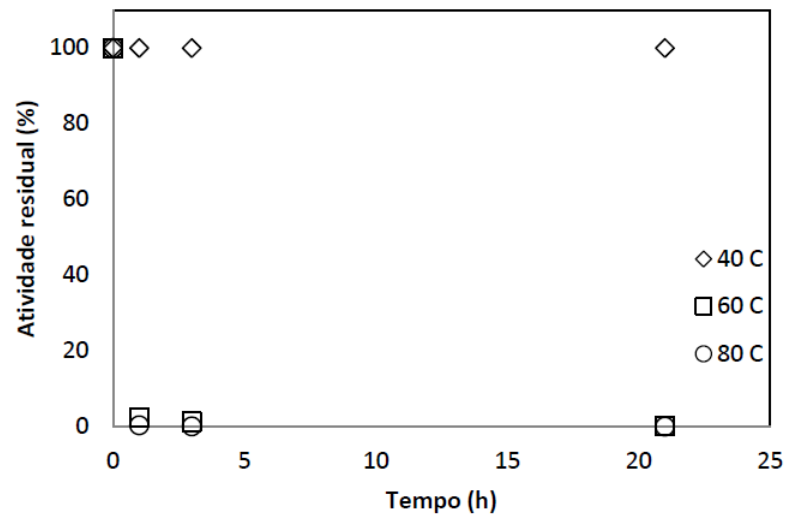
A atividade de esterificação da CalB livre e imobilizada em PU é de 104 U.mL^{-1} e 173 U.g^{-1} de suporte, respectivamente. A enzima não sofreu desnaturação, sendo verificado, inclusive, um aumento na atividade da enzima imobilizada em PU. Cumpre mencionar que este processo é rápido e retém atividade enzimática, conforme mostra o trabalho de Silva et al. (2013).

4.3.3 Estabilidade térmica da CalB livre e imobilizada a altas temperaturas

4.3.3.1 Lipase CalB imobilizada em PHBV

Após determinar a melhor condição para imobilização da lipase em PHBV (120 min e pH 7) foi realizada a avaliação da estabilidade de temperatura da solução enzimática diluída em tampão e imobilizada em função do tempo. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 20 e 21.

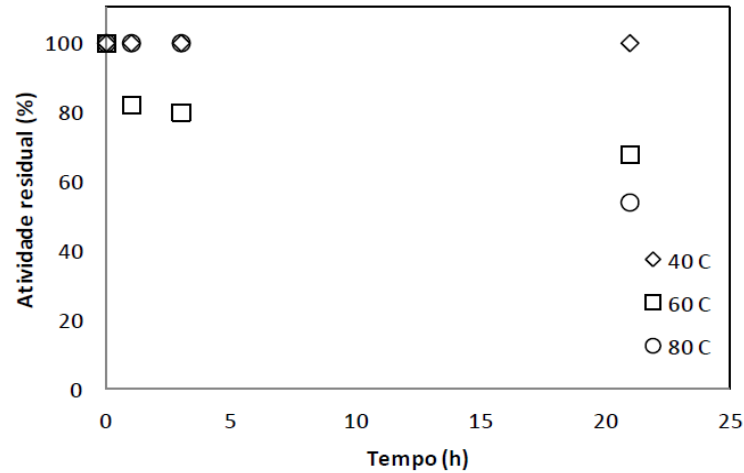
Figura 20 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB livre como função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).



Após 21 horas de exposição observou-se que a atividade da enzima livre submetida à temperatura de 40 °C apresentou-se estável, mantendo atividade residual de 100 % em relação à atividade inicial da lipase CalB livre. Na temperatura de 60 °C a atividade apresentou queda acentuada, mantendo uma atividade residual de 0,23%, após 21 horas. A alta temperatura desnatura rapidamente a enzima livre, esse fato é confirmado na temperatura de 80 °C, quando a atividade também apresentou queda, e após 21 horas perdeu 100% de sua atividade inicial.

O estudo da estabilidade à temperatura da lipase CalB livre foi estudada por Arroyo et al. (1999), os quais obtiveram como resultado após 1 hora de exposição a 50 °C somente 30% da sua atividade inicial. A estabilidade da CalB a alta temperatura também foi avaliada por Silva et al. (2012a), onde atividade da enzima de *Candida antarctica* B livre após 21 h de exposição a 60 °C perdeu totalmente sua atividade. Desta forma, os resultados obtidos na presente pesquisa seguem em conformidade aos já relatados pela literatura.

Figura 21 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PHBV em função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).



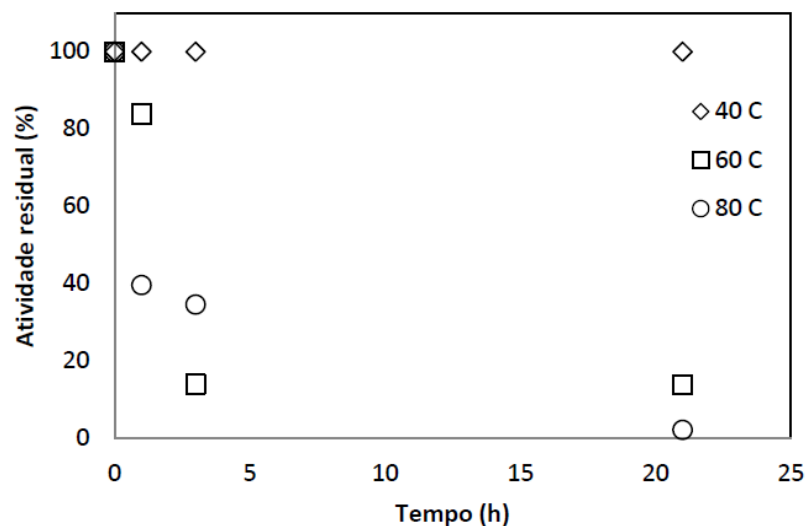
Após 21 horas de exposição observou-se que a atividade da CalB imobilizada submetida à temperatura de 40 °C apresentou-se estável, em relação à atividade inicial da lipase CalB imobilizada. Nas temperaturas de 60 e 80 °C a atividade apresentou queda, mantendo uma atividade residual de 67 e 54 % respectivamente, em relação à atividade inicial da CalB imobilizada, após 21 horas (Figura 21). Cabe ressaltar que Silva et al. (2012a) utilizaram diversas preparações de quitosana para imobilizar a lipase *Candida antarctica* B e a estabilidade térmica destas a 60 °C por 21 horas, apresentaram uma atividade residual em torno de 40 e 50% na temperatura de 80 °C, onde a dosagem da atividade hidrolítica foi realizada em *p*-nitrofenil butirato.

Desta forma, foi possível observar que a imobilização da CalB em PHBV à baixa pressão, em pH 7 e com tempo de imobilização de 120 minutos aumentou o tempo de estabilidade da enzima nas temperaturas de 60 e 80 °C, relacionadas pela dosagem da atividade de hidrólise do *p*-nitrofenil butirato. Cabe ressaltar que a atividade da CalB imobilizada após 3 horas de exposição a 80 °C foi 100% da inicial imobilizada (Figura 21), comparada a total inativação da enzima livre neste mesmo tempo e temperatura (Figura 20).

4.3.3.2 Lipase CalB imobilizada em PU

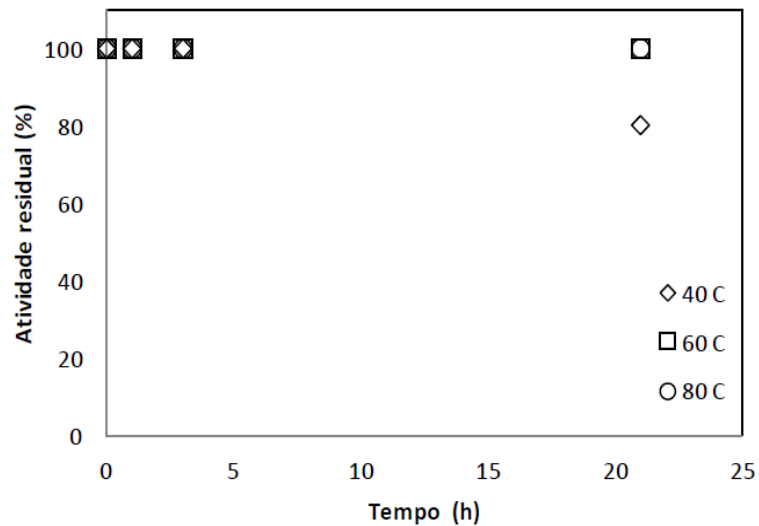
Após determinar a melhor condição para imobilização da lipase em PU (5:3 (v/v) de poliol e isocianato), foi realizada a avaliação da estabilidade da enzima livre e imobilizada em função do tempo de exposição a diferentes temperaturas. Os resultados obtidos para a enzima livre e imobilizada em PU encontram-se apresentados nas Figuras 22 (CalB livre à altas temperaturas) e 23 (CalB imobilizada em PU à altas temperaturas).

Figura 22- Avaliação da estabilidade da lipase CalB livre como função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).



Após 21 horas de exposição observou-se que a atividade da enzima livre submetida à temperatura de 40 °C não apresentou queda, mantendo uma atividade residual de 100 % em relação à atividade inicial da lipase CalB livre. Na temperatura de 60 °C também apresentou queda, mantendo uma atividade residual de 6,74 % em relação à atividade inicial da enzima (Figura 22). A alta temperatura degrada rapidamente a enzima livre, esse fato é confirmado na temperatura de 80 °C, quando a atividade residual após 21 horas de exposição apresenta atividade residual de 2,14 % em comparação com a inicial da CalB livre.

Figura 23- Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PU como função do tempo de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).



Em relação à estabilidade de temperatura da enzima imobilizada submetida à exposição a 40 °C, durante as primeiras 3 horas permaneceu com a atividade constante, não demonstrando queda. Após 21 horas de exposição, observou-se que a atividade da enzima imobilizada submetida a temperatura de 60 e 80 °C não apresentou queda, mantendo uma atividade residual de 100% em relação à atividade inicial da CalB imobilizada.

O acompanhamento da estabilidade à temperatura foi monitorada por vários dias. Após 15 dias de exposição a 40, 60 e 80 °C, a atividade residual foi nula, sendo a CalB imobilizada inativada em ambas temperaturas.

4.3.3.3 Resumo da estabilidade térmica da lipase CalB livre e imobilizada em diferentes suportes

A Tabela 9 apresenta um resumo da estabilidade da CalB livre e imobilizada em PHBV e PU exposta a altas temperaturas (40, 60 e 80 °C), após 21 horas de exposição.

Tabela 9- Estabilidade da CalB livre e imobilizada após 21 horas de exposição à altas temperaturas (40, 60 e 80 °C).

Temperatura (°C)	Atividade Residual (%)			
	Atividade Hidrolítica (U.mL ⁻¹ e U.g ⁻¹)		Atividade de Esterificação (U.mL ⁻¹ e U.g ⁻¹)	
	CalB livre	CalB/PHBV	CalB livre	CalB/PU
40	100	100	100	100
60	0,23	67,72	6,74	100
80	0	54	2,14	100

A Tabela 9 apresenta os valores de atividade residual obtidas nas diferentes temperaturas de exposição (40, 60 e 80 °C) da CalB livre e imobilizada em PHBV e PU à baixa pressão. Considerando que as dosagens de atividade para a imobilização em PHBV foi em termos de hidrólise do *p*-nitrofenil butirato e para PU de esterificação do ácido oléico e etanol, os sistemas não podem ser comparados em termos de valores, contudo, a tendência do aumento da estabilidade para cada suporte pode ser verificado. Os resultados demonstram que para reações de síntese, a imobilização em PU possibilitou maior estabilidade da enzima no tempo avaliado.

A estabilidade da lipase CalB solúvel livre e imobilizada em diferentes preparações de quitosana foi avaliada na temperatura de 60 °C por 21 horas, onde verificou-se que a enzima livre reduziu 100% de sua atividade e a CalB imobilizada manteve em torno de 40% de sua atividade (Silva et al., 2012a).

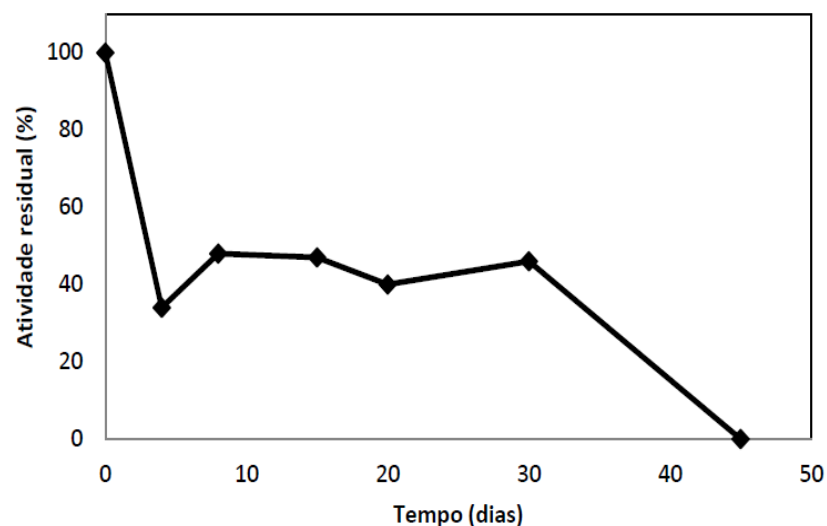
Segundo Cui et al. (2013), a lipase de *Yarrowia lipolytica* livre e imobilizada em poliuretano submetida a uma temperatura de 50 °C por 30 min manteve uma atividade residual de 5 e 44%, respectivamente.

4.3.4 Estabilidade térmica da CalB livre e imobilizada à baixa temperatura e temperatura ambiente

4.3.4.1 Lipase CalB imobilizada em PHBV

A avaliação da estabilidade de estocagem da lipase CalB imobilizada em PHBV foi realizada em geladeira (4 °C). Os resultados obtidos após 21 horas de exposição podem ser evidenciados na Figura 24.

Figura 24 – Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PHBV em função do tempo de estocagem a 4 °C.

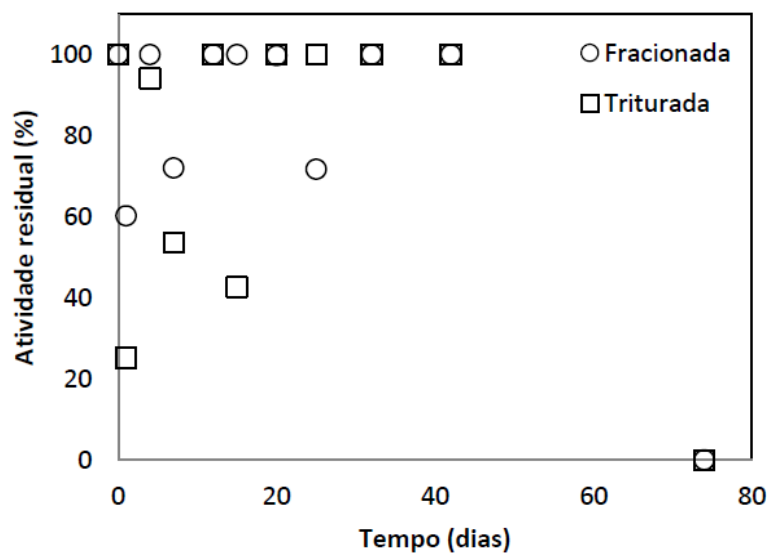


Os resultados apresentaram algumas oscilações na atividade residual, entre o período de tempo de estocagem, possivelmente devido à aglomeração das nanopartículas de PHBV, visualmente observadas durante este período, relativo ao próprio comportamento deste suporte, o que pode dificultar a amostragem da enzima imobilizada. A estabilidade de estocagem da enzima imobilizada seca em geladeira foi acompanhada durante 45 dias, sendo que aos 30 dias de armazenagem 50% da atividade inicial do derivado enzimático ainda era mantida.

4.3.4.2 Lipase CalB imobilizada em PU

A avaliação da estabilidade de armazenamento das enzimas imobilizadas à baixa temperatura e temperatura ambiente foi realizada de duas formas: fracionada e triturada. A estabilidade da enzima imobilizada foi avaliada na forma fracionada e triturada conforme apresentam as Figuras 25 (CalB imobilizada armazenada à temperatura ambiente) e 26 (CalB imobilizada armazenada em geladeira).

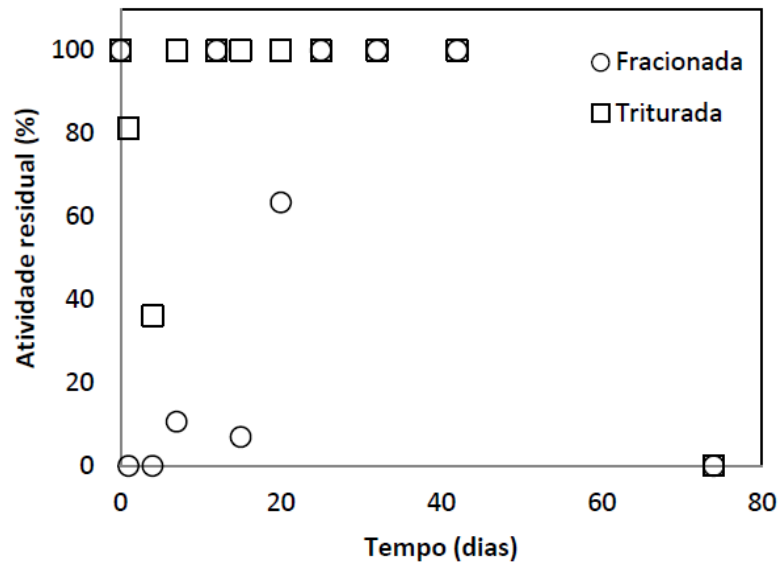
Figura 25 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PU em função da temperatura ambiente.



A enzima CalB imobilizada em PU, tanto na forma triturada quanto fracionada, apresentou comportamento similar. O comportamento da enzima CalB frente ao suporte PU é instável, apresentando várias oscilações. Fato que requer maior estudo, pois a ocorrência de reações durante o armazenamento são possíveis. Durante a polimerização do poliuretano pode ocorrer a imobilização por inclusão ou ligações o que possivelmente está alterando estas diferentes formas e frações dos imobilizados. A estabilidade da CalB imobilizada em PU foi de 74 dias. Estes resultados demonstram que a utilização de espumas de poliuretano, como suporte, na imobilização de enzimas, mantém a atividade por vários dias em temperatura ambiente. Resultado similar foi obtido por Ferraz et al. (2012), onde foram avaliadas a estabilidade de extratos enzimáticos obtidos a partir de farelo de arroz, farelo de

soja e bagaço de cana a temperatura ambiente por 60 dias, onde os resultados mostraram a tendência de manutenção por mais tempo a atividade nesta condição de temperatura.

Figura 26 - Avaliação da estabilidade da lipase CalB imobilizada em PU em função da temperatura de 4 °C.



A enzima CalB imobilizada em PU na forma triturada apresenta um comportamento mais linear se comparada com a fracionada. O comportamento da enzima CalB frente ao suporte PU é muito instável, apresentando varias oscilações. Fato que requer maior estudo, pois a ocorrência de reações durante o armazenamento são possíveis. As oscilações que ocorrem durante o armazenamento em geladeira são similares as que ocorrem a temperatura ambiente. A estabilidade da CalB imobilizada em PU foi de 74 dias.

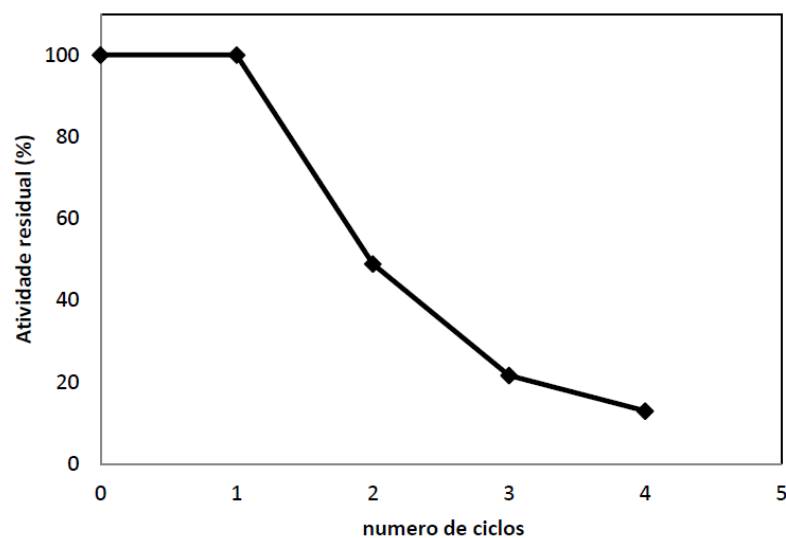
Com base nestes resultados pode-se verificar que o armazenamento, tanto na forma fracionada como triturada, não interfere na atividade da enzima CalB imobilizada em PU.

4.3.5 Avaliação da capacidade de reciclo da CalB imobilizada

Em relação à estabilidade operacional da lipase de *Candida antarctica* B em PHBV, foram testadas por 4 ciclos onde pode-se constatar que a mesma manteve sua atividade inalterada.

O efeito da atividade da lipase CalB imobilizada em PU foi investigada pela síntese em ácido oléico e etanol, como mostra a Figura 27.

Figura 27 - Estabilidade operacional da reação de esterificação do ácido oléico para CalB imobilizada em poliuretano.



A enzima CalB imobilizada em PU apresenta a cada ciclo um decréscimo na atividade e após 4 ciclos de reação a atividade residual passa a ser 12,9 %.

Segundo Rodrigues et al. (2008), a lipase CalB solúvel imobilizada em carvão ativado para síntese de butil butirato, após 6 ciclos, retém de 10 a 15% de sua atividade inicial. De acordo com o trabalho de Guncheva et al. (2011), a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em poliuretano, mantém 80% de sua atividade inicial após 15 ciclos, sendo aplicado na esterificação de ácido palmítico com álcool etílico. A inulinase imobilizada em poliuretano manteve 49,7 e 49,4% de sua atividade inicial após 24 ciclos de reutilização em sacarose e inulina, respectivamente (Silva et al., 2013). A estabilidade operacional da lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada em espumas de poliuretano para síntese de lauril laurato foi estudada por Cui et al.

(2013), onde o biocatalisador manteve, após 15 ciclos de reação, um rendimento em produto de 92%.

4.4 Caracterização dos suportes e da CalB imobilizada

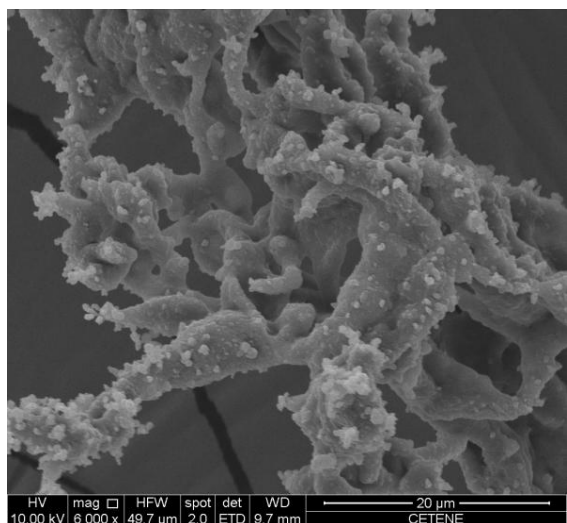
4.4.1 Análise de BET

A partir das isotermas de adsorção do nitrogênio a área superficial das nanopartículas de PHBV foi nula, pois ao ser tratado com dióxido de carbono supercrítico as partículas se tornam mais compactas impedindo assim a identificação do diâmetro de poro.

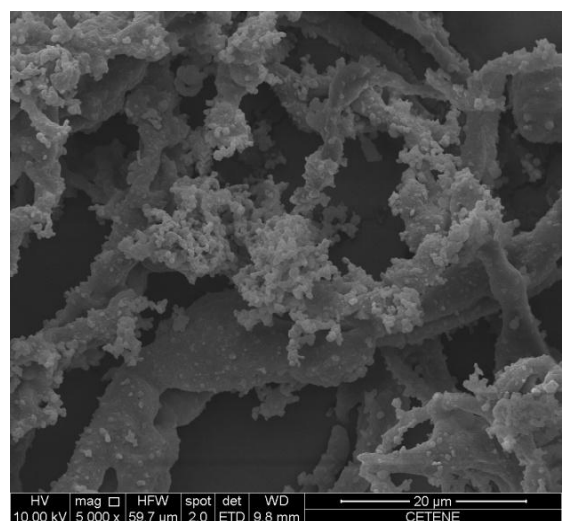
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura do PHBV

A precipitação do polímero PHBV em dióxido de carbono supercrítico utilizando a técnica SEDS resultou na formação de nanofibras de 5 a 7 μm de largura e, após a imobilização, ocorreu um aumento na espessura das nanofibras para valores entre 7 a 10 μm , conforme mostra a Figura 28.

Figura 28 - Micrografias de nanopartículas de PHBV (a); nanopartículas de PHBV com enzima CalB (b).



(a)



(b)

As micrografias demonstram existência de similaridade morfológica entre as estruturas do suporte de PHBV e do PHBV com enzima imobilizada. As enzimas imobilizadas possuem maior tamanho de partícula, este fato está possivelmente relacionado com as pequenas aglomerações formadas durante a imobilização.

4.4.3 Análise de DRX

4.4.3.1 PHBV

A cristalinidade das nanofibras foi avaliada pela análise de DRX. Os difratogramas do suporte e do CalB imobilizado em PHBV são apresentados nas Figuras 29 e 30, respectivamente.

Figura 29 - Difratogramas de raios X das amostras de PHBV precipitado.

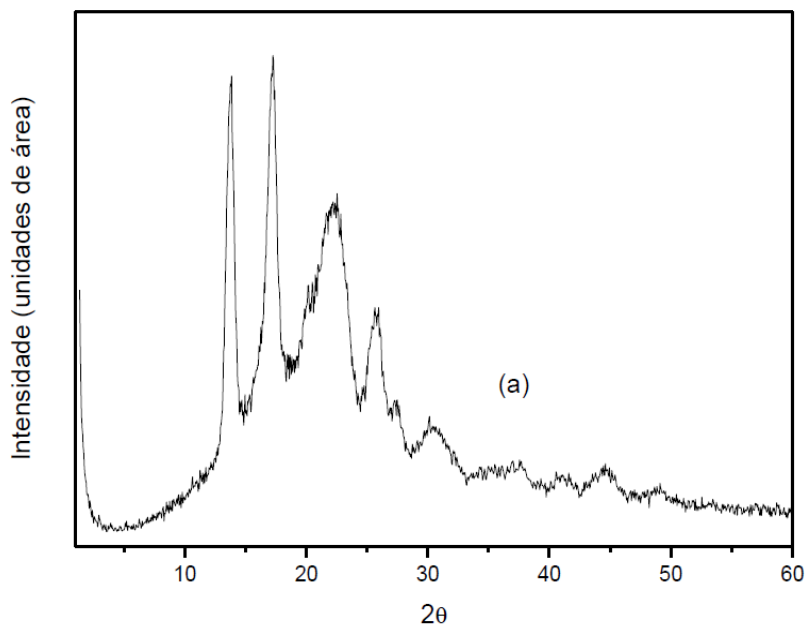
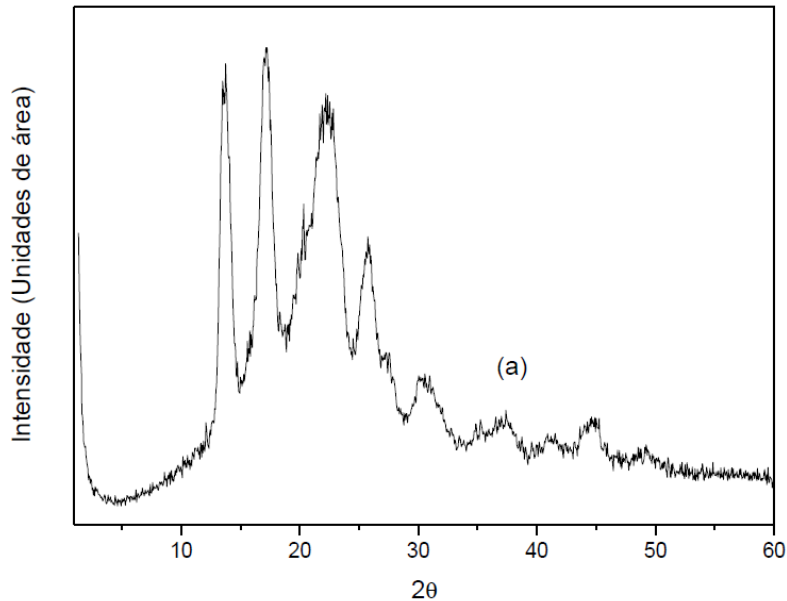


Figura 30 - Difratogramas de raios X das amostras de CalB immobilizada em PHBV.



Os difratogramas para ambas as amostras exibem reflexões intensas e definidas indicando que o material possui estrutura cristalina. Os compostos cristalinos apresentam estrutura organizada e conseqüentemente uma superfície mais uniforme. Comparando as figuras observa-se o mesmo comportamento, ou seja, aparecem os mesmos planos cristalinos (mesmas reflexões). Este resultado era esperado tendo em vista que a imobilização ocorre com uma enzima solúvel, sua estrutura permanece praticamente inalterada. Perfis de difração similares para PHBV puro foram encontrados por Senhorini et al. (2012), onde o difratograma deste composto apresentou valores de 2θ correspondentes aos planos cristalinos na faixa de 13 a 30°.

4.4.3.2 Poliuretano

Os difratogramas do poliuretano puro e enzima CalB immobilizada em PU estão apresentados nas Figuras 31 e 32.

Figura 31 - Difratoformas de raios X das amostras de PU puro.

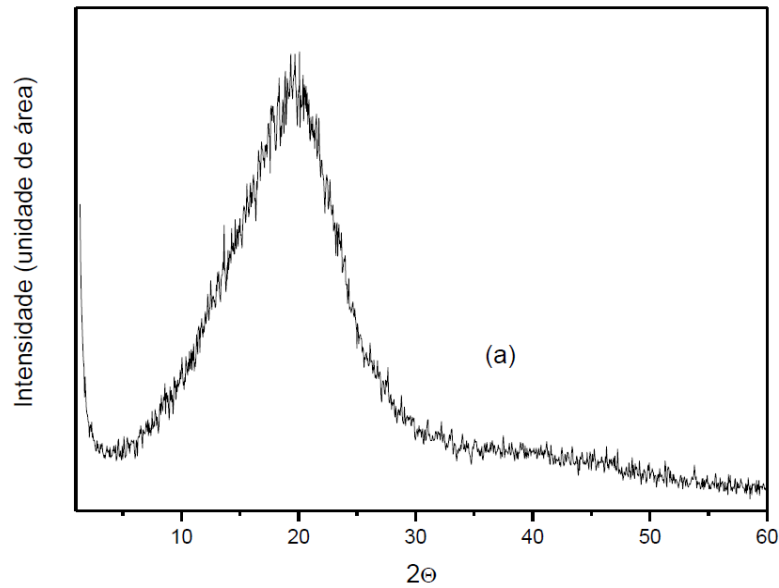
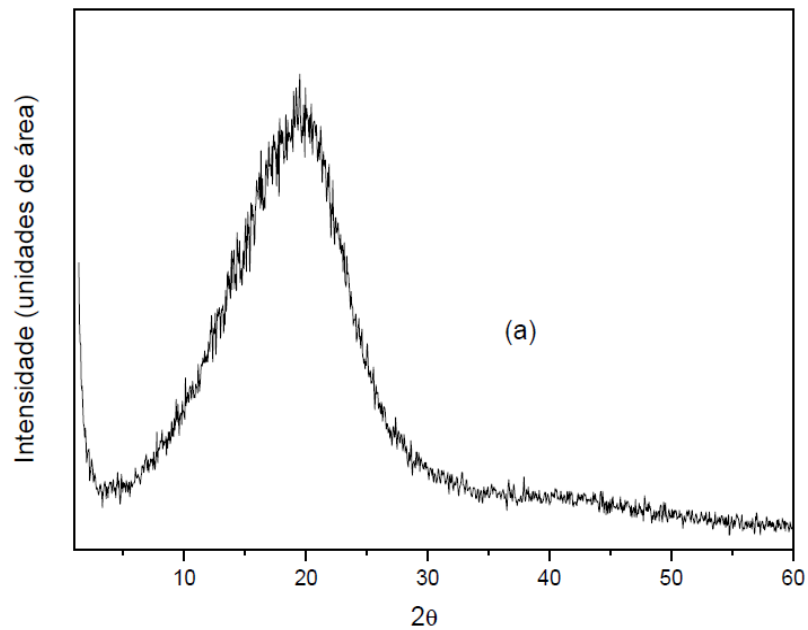


Figura 32 - Difratoformas de raios X das amostras de CalB immobilizada em PU.



Os difratogramas para ambas as amostras exibem um pico alargado, ou seja, o material possui estrutura mais amorfa. Comportamento similar foi identificado por Silva et al. (2012b) onde foi caracterizado o poliuretano puro e poliuretano com argila. A caracterização do poliuretano puro também foi relatado no trabalho de Fiorio (2011), onde a presença de um pico alargado foi identificado em $2\theta - 20^\circ$.

4.5 Avaliação da aplicação da lipase CalB imobilizada na catálise de reações de síntese

A aplicação da lipase imobilizada em PHBV e PU na catálise de reações para síntese enzimática dos ésteres geranil oleato, geranil propionato e oleato de etila estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Conversões reacionais obtidas nas reações catalisadas pela CalB imobilizada em PHBV e PU na esterificação de geraniol com ácido oléico e propiônico e do ácido oléico e etanol.

	Conversão Lipase CalB Imobilizada (%)	
	PHBV	PU
Geranil oleato	88,0	87,7
Geranil propionato	0	0
Oleato de etila	17,4	19,3

A aplicação do imobilizado nas reações de produção de geraniol oleato apresentou 88,0 e 87,7% de rendimento, respectivamente. Resultado similar foi reportado por Paroul et al. (2011), onde foi utilizada a razão molar geraniol:ácido oléico 3:1 (v/v), a 40 °C, 160 rpm com 10% enzima imobilizada, obtendo um rendimento de 93,0 %. Para ambas as enzimas imobilizadas, a reação com geraniol e ácido propiônico não apresentou conversão. Para a síntese de oleato de etila, a CalB imobilizada em PHBV e PU apresentou 17,4 e 19,3 % de rendimento, respectivamente.

Alguns estudos apresentados na literatura relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e alcoóis. Paroul (2011) otimizou a 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% em produto.

De um modo geral, a lipase CalB imobilizada em PHBV e PU testada para a esterificação enzimática conduziram a conversões satisfatórias, indicando que um estudo mais detalhado deve ser realizado, buscando a otimização do processo, para os extratos que apresentam, neste sistema reacional, maior potencial de aplicação como biocatalisador.

5. CONCLUSÕES

A formação de nanopartículas tem sido estudada no encapsulamento de substâncias bioativas com êxito. Várias substâncias já foram encapsuladas a alta pressão, na sua maioria com a utilização de dióxido de carbono como fluido supercrítico.

O PHBV apresentou-se solúvel apenas em diclorometano, limitando as possibilidades de imobilização de enzimas a serem investigadas pelo processo de co-precipitação e técnica SEDS empregando CO₂ como antissolvente. A lipase Amano PS utilizada neste estudo apresentou solubilidade parcial em diclorometano puro, mas quando da adição do polímero a solubilidade aumentou.

A imobilização da CalB em PHBV a baixa pressão indicou que o melhor tempo e pH de imobilização foram 120 min e 7, respectivamente.

A enzima livre após 21 horas de exposição a altas temperaturas apresentou valores de atividade inferior a 15% o que era esperado devido a desnaturação da lipase. A CalB/PHBV apresentou boa estabilidade nas temperaturas de 60 e 80 °C mantendo mais de 50% de sua atividade inicial após 21 horas de exposição. A lipase CalB imobilizada em nanopartículas de PHBV possui boa estabilidade a altas temperaturas se comparada com a CalB livre. Em relação à exposição a baixa temperatura, a CalB apresentou um comportamento estável durante o período de 45 dias.

A lipase CalB imobilizada em PU apresentou um aumento se comparada a lipase na forma livre, durante a exposição por 21 horas a altas temperaturas a atividade manteve-se inalterada, ressaltando a eficiência do biocatalisador. Quanto à exposição à baixa temperatura tanto em geladeira como ambiente, seja na forma triturada como fracionada, a atividade se manteve pelo período de 74 dias.

Quanto ao reciclo operacional, tanto para CalB imobilizada em PHBV como em PU, apresentaram atividade por 4 ciclos.

Em termos de aplicação da lipase CalB imobilizada em nanopartículas de PHBV e espuma de poliuretano ambas apresentaram conversão para síntese de geranyl oleato e oleato de etila.

Portanto, de uma forma mais ampla, é possível concluir que a imobilização utilizando nanopartículas de PHBV, suporte biodegradável, apresenta uma nova possibilidade para imobilização da lipase CalB, contudo outros aspectos do processo de imobilização ainda devem ser avaliados e aprimorados. Em relação ao suporte PU sua estabilidade a altas temperaturas e alta atividade se torna um fator de particular interesse para aplicação em processos industriais, podendo-se considerar uma alternativa viável na aplicação como catalisador em reações de esterificação.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Utilização de blendas, mistura de outros polímeros ao PHBV;
- Análise morfológica e estrutural da espuma de poliuretano;
- Estudo das condições de produção do sistema selecionado em termos de concentração da enzima (% (m/m) em relação aos substratos) e da razão molar dos substratos envolvidos na reação de aplicação;
- Variação da razão molar, tempo de reação, temperatura e concentração de enzima visando otimizar a produção enzimática.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. **Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antarctica* lipases.** *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3177-3180, 2005.
- ANDERSON, E. M.; LARSSON, K.M.; KIRK, O. **The use of *Candida antarctica* lipase B in organic synthesis.** *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 16, p. 181-204, 1998.
- ANDRADE, L. H.; REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E. **Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 55-62, 2010.
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. **Lipase applications in food industry.** *Indian Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 141-158, 2007.
- ARROYO, M.; SANCHEZ-MONTEIRO, J. M.; SINISTERRA, J. V. **Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 3-12, 1999.
- BAHRAMI, M.; RANJBARIAN, S. **Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 40, p. 263 -283, 2007.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. **Bioreactors with immobilized lipases: State of the art.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P. S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. **Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment.** *New Biotechnology*, v. 28, p. 627-638, 2011.

- BRIGIDA, A. I. S. **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra de casca de coco verde como suporte.** Dissertação de Mestrado. Fortaleza-CE, 2006.
- BRIGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 136, p. 67-80, 2007.
- BRIGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 146, p. 173-187, 2008.
- BRUNNER, G. **Supercritical fluids: technology and application to food processing.** Journal of Food Engineering, v. 67, p. 21-33, 2005.
- BRUSAMARELO, C. Z.; ROSSET, E.; DE CÉSARO, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of lipase-catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl esters in pressurized propane.** Journal of Biotechnology, v. 147, p. 108–115, 2010.
- BURTON, S. G.; COWAN, D. A.; WOODLEY, J. M. **The search for the ideal biocatalyst.** Nat. Biotechnol, v. 20(1), p. 37-45, 2002.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados.** Química Nova, v. 26, p.75-80, 2003.
- CASTILHO, L. R. **Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells.** VDI-Verlag, Alemanha, 2001.

- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Química Nova, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CAVALCANTI, E. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA, G. L. **Lipase production by solid-state fermentation in Fixed-Bed bioreactors**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 79-84, 2005.
- CHIARADIA, V.; DETOFOL, M.; CANSIAN, R. L.; DALLAGO, R. M.; OLIVEIRA, D.; PAROUL, N. **Produção de mentil acetato via esterificação enzimática em sistema livre de solvente**. Revista Perspectiva, v. 131 (35), p. 35-42, 2011.
- COCERO, M. J.; MARTIN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. **Review: Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 546-555, 2009.
- COGHETTO, C. C.; SCHERER, R. P.; SILVA, M. F.; GOLUNSKI, S.; PERGHER, S. B. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. **Natural montmorillonite as support for the immobilization of inulinase from Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 1, p. 284-289, 2012.
- CORAZZA, M. L.; CARDOZO FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C.; DARIVA, C. **High pressure phase equilibria of the related substances in the limonene oxidation in supercritical CO₂**. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 48, p. 354-358, 2003.
- CORREIA, A. C. V. B.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, M. S. L. **Produção de emulsionantes através da glicerólise de óleo de bagaço de azeitona catalisada pela lipase da *Candida Rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano**. Millenium, v. 41, p. 7-15, 2011.

- COSTA, M. S.; DUARTE, A. R. C.; CARDOSO, M. M.; DUARTE, C. M. M. **Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles.** International Journal of Pharmaceutics, v. 328, p. 72-77, 2007.
- CRUZ, J. C.; PFROMM, P. H.; REZAC, M. E. **Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica.** Process Biochemistry, v. 44, p. 62-69, 2009.
- CUI, C.; TAO, Y.; LI, L.; CHEN, B.; TAN, T. **Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 91, p. 59– 66, 2013.
- DALLA ROSA, C.; MORANDIN, M. B.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 47, 49-53, 2008.
- DALLA ROSA, C.; MORANDIN, M. B.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. **Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids.** Bioresource Technology, v. 100, 5818-5826, 2009.
- DALLA VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. **Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks.** Bioresource Technology, v. 101, p. 5508-5516, 2010.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. **Enzyme immobilization: an overview on techniques and support.** 3 Biotech, v. 3, p. 1–9, 2013.

- DUARTE, A. R. C.; SIMPLICIO, A. L.; VEJA-GONZÁLEZ, A.; SUBRA-PATERNAULT, P.; COIMBRA, P.; GIL, M. H.; SOUZA, H. M.; DUARTE, C. M. M. **Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophthalmic drug delivery.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 42, p. 373-377, 2007.
- DULINSKA-MOLAK, I.; LEKKA, M.; KURZYDŁOWSKI, K. J. **Surface properties of polyurethane composites for biomedical applications.** *Applied Surface Science*, v. 270, p. 553– 560, 2013.
- EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. **High pressure enhancement of enzymes: A review.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 331-347, 2009.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry.** 3 ed, Springer-Verlag: Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, 1997.
- FERREIRA, E. M. M. **Uso de espuma de poliuretano na extração de Índio de meio iodeto,** Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
- FERRAZ, L. R; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. **Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 243-252, 2012.
- FIORIO, R. **Síntese e caracterização de poliuretano termoplástico contendo POSS via extrusão reativa.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, PA – Brasil, 2011.
- 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.

- FRANCESCHI, E. **Precipitação e encapsulamento de β - caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - Brasil, abril de 2009.
- FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. **Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂.** Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 259-269, 2008.
- FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. **Precipitation of b-carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂.** Journal of Food Engineering, v. 95, p. 656-663, 2009.
- FRANKEN, L. P. G.; MARCON, N. S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. **Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity.** Food Bioprocess Technology, v. 3, p. 511–520, 2010.
- FUSARO, F.; KLUGE, J.; MAZZOTTI, M.; MUHRER, G. **Compressed CO₂ antisolvent precipitation of lysozyme.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 49, p. 79-92, 2009.
- GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. **Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation.** Powder Technology, v. 197, p. 211-217, 2010.
- GARCIA, T.; COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. **Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst.** Chemical Engineering Science, v. 55, p. 1411-1423, 2002.
- GARCIA, M. B. F. **Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase imobilizada em**

- bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC - Brasil, 2010.
- GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis.** Process Biochemistry, v. 46, p. 923-930, 2011.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases,** Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review.** Biotechnology Advances, v. 27, p. 782-798, 2009.
- HENDRICKX, M.; LUDIKHUYZE, L.; VAN DEN BROECK, I.; WEEMAES, C. **Effects of high pressure on enzymes related to food quality.** Trends in Food Science & Technology, v. 9, p. 197-203, 1998.
- HONG, H. L.; SUO, Q. L.; HAN, L. M.; LI, C. P. **Study on precipitation of astaxantin in supercritical fluid.** Powder Technology, v. 191, p. 294-298, 2009.
- IDRIS, A.; BUKHARI, A. **Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis.** Biotechnology Advances, v. 30, p. 550-563, 2012.
- INOGLU, N.; KAYRAK-TALAY, D.; HORTAÇSU, O. **Glucose oxidase immobilization by polyurethane film/foam in dense CO₂ environment.** Process Biochemistry, v. 43, p. 271-279, 2008.
- JAVADI, A.; SRITHEP, Y.; PILLA, S.; LEE, J.; GONG, S.; TURNG, L. **Processing and characterization of solid and microcellular PHBV/coir fiber composites.** Materials Science and Engineering C, v. 30, p. 749-757, 2010.

- JUNG, J.; PERRUT, M. **Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey.** Journal of Supercritical Fluids, v. 20, p. 179-219, 2001.
- KANG, Y.; YIN, G.; OUYANG, P.; HUANG, Z.; YAO, Y.; LIAO, X.; CHEN, A.; PU, X. **Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS).** Journal of Colloid and Interface Science, v. 322, p. 87 - 94, 2008.
- KAPOOR, M., GUPTA, M. N. **Lipase promiscuity and its biochemical applications.** Process Biochemistry, v. 40, p. 1-15, 2012.
- KIKIC, I. **Review: Polymer-supercritical fluid interactions.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 47, p. 458-465, 2009.
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. **Nanostructures for enzyme stabilization.** Chemical Engineering Science, v. 61, p. 1017-1026, 2006.
- KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. **The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor.** Structure, v. 5, p. 173-185, 1997.
- KIM, M. S.; LEE, S.; PARK, J. S.; WOO, J. S.; HWANG, S. J. **Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: effect of process parameters.** Powder Technology, v. 177, p. 64 – 70, 2007.
- KLOSS, J, R. **Síntese e caracterização de poliuretanos biodegradáveis à base de póli(ϵ -Caprolactona)Diol.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Parana- Curitiba, 2007.
- KLUGE, J.; FUSARO, F.; CASAS, N.; MAZZOTTI, M.; MUHRER, G. **Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: I. Encapsulation of lysozyme.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 50, p. 327-335, 2009.

- KUHN, G.; MARANGONI, M.; FREIRE, D. M. G.; SOARES, V. F.; GODOY, M. G. CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Esterification activities of non-commercial lipases after pre-treatment in pressurized propane.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 85, p. 839- 844, 2010.
- KUHN, G.; COGHETTO, C.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite.** Process Biochemistry, v. 46, p. 2286–2290, 2011.
- KWON, C. H.; SHIN, D.Y.; LEE, J. H.; KIM, S. W.; KANG, J.W. **Molecular modeling and its experimental verification for the catalytic mechanism of *Candida antarctica* lipase B.** Journal Microbiology Biotechnology, v. 17(7), p.1098 - 1105, 2007.
- LARIOS, A.; GARCIA, H.S.; OLIART, R.; VALERIO-ALFARO, G. M. **Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 65(4), p. 373-376, 2004.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial; Processos Fermentativos e Enzimáticos (Imobilização de enzimas (Michele Vitolo).** Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, SP, v. 3, p. 391-394, 2001.
- LIU, Y.; JIA, S.; WU, Q.; RAN, J.; ZHANG, W.; WU, S. **Studies of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles prepared by co-precipitation under the magnetic field for lipase immobilization.** Catalysis Communications, v. 12, p. 717-720, 2011.
- LORENZ, P.; ECK, J. **Metagenomics and industrial applications.** Nat Rev Microbiol., v. 3 (6), p. 510-516, 2005.
- 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.
- LOZANO, P.; VILLORA, G.; GOMEZ, D.; GAYO, A. B.; SANCHEZ-GONESA, J. A.; RUBIO, M.; IBORRA, J. L. **Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 29, p. 121-128, 2004.
- MACHADO, A. C. O. **Obtenção de Intermediários Quirais Utilizando Lipases em Reatores Assistidos por Membranas.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ- Brasil, 2011.
- MAGNAN, E.; CATARINO, I.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; PREZIOSI-BELLOY, L.; BELLEVILLE, M. P. **Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability.** *Journal of Membrane Science*, v. 241, p. 161–166, 2004.
- 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*, v. 35, 277-283, 2004.
- MARIOTTI, P. M. **Hidrólise de lactose de soro de leite por meio de β – galactosidase imobilizada.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, Brasil, 2000.
- 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 (3), p. 665-675, 2004.
- 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.

- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2° ed. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ, p. 59-61, 1999.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B. C. C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. **Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 456-462, 2005.
- 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.
- MATSUI, M. **Correlações entre estrutura química, super-estrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR – Brasil, 2007.
- MAUGARD, T.; LEGOY, M. D. **Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin A in organic media**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 8, p. 275-280, 2000.
- 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.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDAN, R. L. C. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial**. *Química Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011.
- MENG, Q.; HU, J.; MONDAL, S. **Thermal sensitive shape recovery and mass transfer properties of polyurethane/modified MWNT composite membranes**

synthesized via *in situ* solution pre-polymerization. Journal of Membrane Science, v. 319, p.102–110, 2008.

MILAŠINOVIĆ, N.; MILOSAVLJEVIĆ, N.; FILIPOVIĆ, J.; KNEZEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.; KRUŠIĆ, M. K. **Synthesis, characterization and application of poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization.** Reactive & Functional Polymers, v. 70, p. 807-814, 2010.

MOSHASHAÉE, S.; BISLAT, M.; FORBES, R. T.; NYQVIST, H.; YORK, P. **Supercritical fluid processing of proteins I: Lysozyme precipitation from organic solution.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 11, p. 239-245, 2000.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** Journal of Supercritical Fluids, v. 38, p. 373–382, 2006.

PAN, S.; LIU, X.; XIE, Y.; YI, Y.; LI, C.; YAN, Y.; LIU, Y. **Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media.** Bioresource Technology, v. 101, p. 9822-9824, 2010.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. **The realm of microbial lipases in biotechnology.** Biotechnology Applied and Biochemistry, v. 29, p. 119-131, 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais.** Química Nova, v. 29, p. 93-99, 2006.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. **Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system.** Journal Chemical Technology Biotechnology, v. 85, p. 1636-1641, 2010.

- 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, RS - Brasil, 2011.
- PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. **Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 331-337, 2011.
- PASSICOS, E.; SANTARELLI, X.; COULON, D. **Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure**. *Biotechnology Letters*, v. 26(13), p. 1073-1076, 2004.
- 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.; DA FONSECA, M.M. R.; FERREIRA-DIAS, S. **Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilised in polyurethane foams**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 33, p. 148-158, 2007.
- PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. **Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 246-252, 2010.
- PIROZZI, D.; GRECO JUNIOR, G. **Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 94-100, 2004.
- POOJARI, Y.; CLARSON, S. J. **Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles inorganic media**. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, p. 7–1. 2013.

- POUTON, C. W.; AKHTAR, S. **Biosynthetic polyhydroxyalkanoates an their potential in drug delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 18, p.133-162, 1996.
- PRAMOD, T.; LINGAPPA, K. **Immobilization of *Aspergillus niger* in polyurethane foam for citric acid production from carob pod extract.** *American Journal Food Technology*, v. 3 (4), p. 252-256, 2008.
- PRIAMO, W. L.; DE CEZARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. **Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 54, p. 103-109, 2010.
- RANGEL, S. X.; GARCIA, J.; ORREGO, C. E. **Inmovilización de lipasa de *Candida antarctica* sobre soportes de quitosano-gelatina.** *Revista Colombiana de Química*, v. 40, p. 149-164, 2011.
- REETZ, M.T. **Lipases as practical biocatalysts.** *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6 (2), p. 145-150, 2002.
- REVERCHON, E. **Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nanoparticles.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 15, p.1-21, 1999.
- REVERCHON, E; ADAMI, R. **Review: Nanomaterials and supercritical fluids.** *The Journal Supercritical Fluids*, v. 37, p 1-22, 2006.
- RODRIGUES, D. S.; CAVALCANTE, G. P.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase type b by adsorption on activated carbon.** *Chem. Biochem. Eng. Q.*, v. 22, p. 125–133, 2008.
- ROSEVEAR. A.; KENNEDY. J. F.; CABRAL. J. M. S. **Immobilized enzymes and cells:** Bristol, Adam Hilger, 1987,
- ROTTICCI, D.; NORIN, T.; HULT, K.; MARTINELLE, M. **An active-site titration method for lipases.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1483, p. 132-140, 2000.

- SALIHU, A.; ALAM, MD. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. **Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues.** Resources, Conservation and Recycling, v. 58, p. 36– 44, 2012.
- SCHERER, R.; OLIVEIRA, J. V.; PERGHER, S.; OLIVEIRA, D. **Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase.** Materials Research, v. 14, p. 483-492, 2011.
- SENDIL, D.; GÜRSEL, I.; WISE, D. L.; HASIRCI, V. **Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles.** Journal of Controlled Release, v. 59, p. 207-217, 1999.
- SENHORINI, G. A.; ZAWADZKI, S. F.; FARAGO, P. V.; ZANIN, S. M. W.; MARQUES, F. A. **Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: Preparation and characterization.** Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems, v. 32, p. 1121-1126, 2012.
- SHARMA, R.; CHISTY, Y.; BANERJEE, U. C. **Production purification, characterization and application of lipases.** Biotechnology Advances, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SILVA, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo b imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina a.** Dissertação de mestrado. Fortaleza-CE – Brasil, 2007.
- SILVA, V.C.; 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, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies.** Biochemical Engineering Journal, v. 60, p. 16-24, 2012a.

- SILVA, M. A.; TAVARES, M. I. B.; NASCIMENTO, S. A. M.; RODRIGUES, E. J. R. **Caracterização de nanocompósitos de poliuretano/montmorilonita organofílica por RMN de baixo campo.** *Polímeros*, v. 22, p. 481-485, 2012b.
- SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. **Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam.** *Food and Bioproducts Processing*, v. 91, p. 54-59, 2013.
- STARK, M.B.; HOLMBERG, K. **Covalent immobilization of lipase in organic solvents.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 34, p. 942-950, 1989.
- STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. **The production of fine chemicals by biotransformations.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 548-556, 2002.
- SUN, J.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; GAO, J. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium.** *New Biotechnology*, v. 27, p. 53-58, 2010.
- TAO, J.; SONG, C.; CAO, M.; HUB, D.; LIU, L.; LIU, N.; WANG, S. **Thermal properties and degradability of poly(propylene carbonate)/poly (b-hydroxybutyrate-co-b-hydroxyvalerate) (PPC/PHBV) blends.** *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, 575–583, 2009.
- TU, L. S.; DEHGHANI, F. ; FOSTER, N. R. **Micronisation and microencapsulation of pharmaceuticals using a carbon dioxide antisolvent.** *Powder Technology*, v. 126, p. 134-149, 2002.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JANS, T. A. **The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*.** *Structure*, v. 2, p. 293-308, 1994.

- VALÉRIO, A. ; FIAMETTI, K.G.; ROVANI, S.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M.L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Enzymatic production of mono and diglycerides in compressed n-butane and AOT surfactant.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 49, p.216-220, 2009.
- 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.** Journal of Chromatography B, v. 879, p. 2679 – 2687, 2011.
- VILAR, W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos.** Disponível em <http://www.poliuretanos.com.br>. Acesso em 03 de março de 2013.
- WANG, S.; SONG, C.; CHEN, G.; GUO, T.; LIU, J.; ZHANG, B.; TAKEUCHI, S. **Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite** Polymer Degradation and Stability, v. 87, p. 69-76, 2005.
- WANG, Z. G.; WAN, L. S.; LIU, Z. M.; HUANG, X. J.; XU, Z. K. **Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 56, p. 189-195, 2009.
- WU, K.; LI, J. **Precipitation of a biodegradable polymer using compressed carbon dioxide as antisolvent.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 46, p. 211-216, 2008.
- YASIN, Y.; CEVDET, D.; DIZGE, N.; KESKINLER, B. **Lipase immobilization and production of fatty acid methyl ester from canola oil using immobilized lipase.** Biomass & Bioenergy, v. 35, p. 1496-1501, 2011.
- YOUNG, T. J.; JOHNSTON, K. P.; MISHIMA, K.; TANAKA, H. **Encapsulation of lysozyme in a biodegradable polymer by precipitation with a vapor-over-liquid antisolvent.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 88, p. 640-650, 1999.

ZAIAT, M. **Desenvolvimento e análise de biorreatores anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, SP- Brasil, 2003.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Enzimas Imobilizadas.** In: SAID, S; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 35-86, 2004.

ANEXO A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO *p*-NITROFENOL (pNP)

A seguir esta apresentada a curva de calibração do *p*-nitrofenol, da qual é obtido o fator de correção ($f_c = 0,0742$), utilizado nos cálculos de atividade hidrolítica da enzima CalB imobilizada em PHBV.

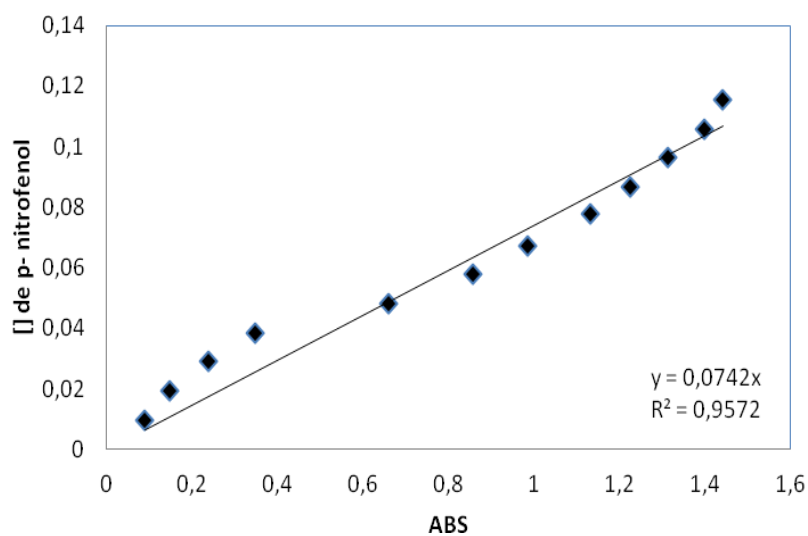


Figura A.1- Curva de calibração do pNP ($\lambda = 410$ nm), utilizada nos cálculos de determinação de atividade enzimática de hidrólise.