

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS  
MISSÕES – URI- ERECHIM**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ANGELA ANTUNES**

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CALB) *IN SITU* EM  
ESPUMA FLEXÍVEL DE POLIURETANO DE DIFERENTES DENSIDADES**

**ERECHIM, RS – BRASIL**

**MARÇO DE 2015**

**ANGELA ANTUNES**

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CAL B) *IN SITU* EM  
ESPUMA FLEXÍVEL DE POLIURETANO DE DIFERENTES DENSIDADES**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de concentração – Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Orientadores: Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago

Profa. Dra. Jamile Zeni

**ERECHIM, RS- BRASIL**

**MARÇO DE 2015**

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CAL B) *IN SITU* EM  
ESPUMA FLEXÍVEL DE POLIURETANO EM DIFERENTES DENSIDADES

Angela Antunes

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

Comissão Julgadora:

---

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago / URI –Erechim  
(Orientador)

---

Profa. Dra. Jamile Zeni / URI-Erechim  
(Orientadora)

---

Profa. Dra. Gean Delise Leal Pasquali Vargas/UFFS - Erechim

---

Prof. Dr. Daniel Jacintho Emmerich/URI-Erechim

---

Profa. Dra. Geciane Toniazzo / URI-Erechim

Erechim, Março de 2015

*A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.*

***Albert Einstei***

*Sonha e serás livre de espírito, luta e serás livre na vida.*

***Ernesto Guevara***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, aos meus anjos e guias protetores. Que me guiaram e mostraram – me sempre o caminho do bem, do amor e da sabedoria.

À minha família, ao meu pai Wilson, que sempre dedicou a mim, todos os cuidados de um pai zeloso e amoroso, e que mesmo muitas vezes longe, sempre esteve por perto em pensamento, me apoiando e torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu irmão Fabiano, que mesmo não demonstrando, por ser de sua personalidade, sempre esteve ao meu lado, acreditando e segurando em minha mão quando se fez necessário.

A minha cunhada Sônia, que sempre esteve comigo, nas alegrias e nas tristezas, que me adotou e que cuida de mim. Que é a minha maior incentivadora, aquela que cresce comigo, aquela que me ensina e por muitas vezes me norteia.

A ela, minha mãezinha Genaire, que por forças maiores, não está mais aqui fisicamente, mas que permanece em meus pensamentos e no coração eternamente. É a ela que dedico mais essa etapa concluída de minha vida. Sem ela nada disso estaria acontecendo, esse é um sonho dela que é realizado por mim. Te Amo!

Ao Professor Rogério Marcos Dallago, por ser mais que um orientador, por ser um amigo, conselheiro, educador, aquele que preocupa-se com seu bem estar, aquele que te tem como filha. Obrigada por quase 10 anos dessa caminhada juntos!

A Professora Jamile Zeni, a quem aprendi a gostar e admirar, como pessoa e como profissional. Obrigada minha Mamis orientadora!

As minhas companheiras de laboratório e agora de vida Aline Ficanha e Nadia Nyari. Obrigada gurias, pelos ensinamentos, parceria, dedicação e por todos os dias e hora intermináveis de trabalho. Ermas, obrigada pela amizade!

Aos bolsistas de iniciação científica (nossas crianças), Katarine, Alessandro, Raquel e Mateus por serem sempre prestativos, dedicados e competentes na realização de todos os trabalhos que lhes era imposto. Obrigada crianças pela ajuda!

Aos meus demais amigos (Fran, Maya, Esbiri, Ba, Rudi, Sami, Delai, Dani, Daise), mas não menos importantes, obrigada pela amizade, carinho, parceria, horas de conversas, desabafos e risos. Obrigada por entenderem minhas ausências durante esse período de muito estudo. Amo vocês!

A uma pessoa que veio de muito longe, e que até o início do mestrado não a conhecia mas que vou levar para sempre no coração, Alice Maria Dahmer. Obrigada pelas horas incansáveis de estudo, dedicação e amizade. Por ser essa pessoa abençoada, e estar por perto quando precisei.

Aos professores Geciane Toniazco e Marcelo Mignon pelas contribuições durante as realizações dos seminários.

A CAPES e a URI pela concessão de bolsa e apoio financeiro. E, por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

Resumo da dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos

## **IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CAL B) *IN SITU* EM ESPUMA FLEXÍVEL DE POLIURETANO COM DIFERENTES DENSIDADES**

Angela Antunes

Março/2015

Orientadores: Dr. Rogério Marcos Dallago

Dra. Jamile Zeni

O presente trabalho teve objetivo avaliar o processo de imobilização de lipase *Candida antarctica* B (CAL B) em PU flexível, processo esse de polimerização, que se obtêm um material com características lineares. O processo de polimerização da enzima se deu com a mistura de monômeros, surfactantes, extensores de cadeia e água. A técnica de imobilização, bem como a estabilidade do imobilizado a diferentes temperaturas, e a capacidade de reciclos reacionais foram avaliadas pela atividade de síntese do ácido oleico e etanol. A fim de otimizar o processo de medida de atividade de esterificação do imobilizado D30 e D18, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizando como variáveis a concentração de enzima e a temperatura de reação. De acordo com os resultados obtidos, processo de imobilização apresentou rendimento igual a 2429,92, 415,65 e 1102,06%, para os imobilizados D30, D20 e D18 (respectivamente) Os experimentos realizados permitiram selecionar os imobilizados que apresentaram os melhores resultados. O DCCR possibilitou a maximização das condições operacionais da medida de atividade (esterificação) para os imobilizados D30 e D18. As maiores atividades foram obtidas nos ensaios do ponto central (40°C, 0,1 g de enzima imobilizada, 40 minutos de reação) com atividade de aproximadamente 1035,00 e 1161,61 U/g, respectivamente. Os resultados do reciclo contínuo demonstraram a possibilidade de reutilizar os imobilizados D30 e D18 por até 5 vezes, considerando 50% de atividade residual. Já os resultados dos reciclos realizados a cada 24 horas e com lavagem em solventes orgânicos, apresentaram reuso por até 15 vezes para ambos os imobilizados (D30 e D18). Em relação a estabilidade térmica dos imobilizados o resultados foram superiores daqueles apresentados pela Lipase de *Candida antactica* B livre.

**Palavras-chave:** Polimerização, CalB, esterificação.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

## **IMMOBILIZATION OF *Candida antarctica* B (CAL B) LIPASE IN FLEXIBLE POLYURETHANEFOAM IN DIFFERENT DENSITIES**

Angela Antunes

March/2015

Advisors: Dr. Rogério Marcos Dallago

Dra. Jamile Zeni

The present study was to evaluate the lipase immobilization process *Candida antarctica* B (CAL B) in flexible PU, a process of polymerization, which is obtained a material with linear characteristics. The polymerization process of the enzyme occurred with the mixture of monomers, surfactants, chain extenders and water. The immobilization technique as well as the stability of immobilized at different temperatures, and the reaction recycles capacity were evaluated by synthesis activity of oleic acid and ethanol. In order to optimize the process of esterification activity of immobilized derivatives (D30 and D18), there was a central composite design (CCRD) using as variables the enzyme concentration and the reaction temperature. According to the results, immobilization process had a yield equal to 2429.92, 415.65 and 1102.06 % for the fixed D30, D20 and D18 (respectively) the experiments allowed to select the immobilized derivatives that showed the best results. The CCRD possible to maximize the operating conditions of the measure activity (esterification) for D30 and D18 immobilized. The highest activities were obtained from the midpoint of the test (40°C, 0.1 g of immobilized enzyme, 40 minutes reaction) with the activity of about 1035.00 and 1161.61 U/g, respectively. The results of continuous recycle demonstrated the possibility of reuse the immobilized derivatives D30 and D18 by up to 5 times, considering 50 % residual activity. However, the results of recycles performed every 24 hours, and washing with organic solvents for reuse presented 15 times for both immobilized (D30 and D18). Regarding the thermal stability of fixed the results were higher than those demonstrated by lipase *Candida antarctica* B free.

**Keywords:** Immobilization, lipase, flexible polyurethane foam, esterification.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 1.1 OBJETIVOS .....   | 15 |
| 1.1.1 Objetivo geral.....   | 15 |
| 1.1.2 Objetivos específicos.....  | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 16 |
| 2.1 LIPASES .....   | 16 |
| 2.1.1 Lipase de Candida antarctica do tipo B (CAL B) .....  | 19 |
| 2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....  | 20 |
| 2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....   | 21 |
| 2.3.1 Poliuretanos (PU'S).....  | 21 |
| 2.3.2 Síntese das espumas de poliuretanos.....  | 22 |
| 2.3.3 Reagentes para síntese de poliuretano.....  | 27 |
| 2.3.3.1 Polióis.....  | 28 |
| 2.3.3.2 Polióis poliéteres .....  | 28 |
| 2.3.3.3 Isocianatos.....  | 29 |
| 2.3.3.4 Catalisadores .....   | 30 |
| 2.3.3.5 Surfactantes .....  | 31 |
| 2.3.3.6 Agentes de expansão .....   | 31 |
| 3.1 ENZIMA E PRODUTOS QUÍMICOS .....  | 32 |
| 3.2 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO .....  | 32 |
| 3.2.1. Rendimento do processo de imobilização.....  | 34 |
| 3.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO IMOBILIZADO PARA UMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....                               | 35 |
| 3.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MEDIDA DE ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO LIPASE Candida antarctica B (CALB) IMOBILIZADA EM POLIURETANO (PU)..... | 35 |
| 3.5 AVALIAÇÃO DO RECICLO OPERACIONAL DOS IMOBILIZADOS D30 E D18 .....   | 36 |
| 3.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA.....  | 37 |
| 3.7. ATIVIDADE ENZIMÁTICA- ESTERIFICAÇÃO.....   | 37 |
| 3.8 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS.....   | 38 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 39 |
| 4.1 SELEÇÃO DO SUPORTE (D30, D20 E D18) DE POLIURETANO FLEXÍVEL NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO .....   | 39 |
| 4.2 AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS TEMPO E TEMPERATURA NA REAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA POR ESTERIFICAÇÃO .....  | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MEDIDA DE ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO OS IMOBILIZADOS D30 E D18..... | 43 |
| 4.3.1 Imobilizado D30.....   | 43 |
| 4.3.2. Imobilizado D18.....  | 46 |
| 4.4 AVALIAÇÃO DO RECICLO OPERACIONAL DO IMOBILIZADO.....   | 49 |
| 4.5 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO .....  | 52 |
| 4.5.1 Avaliação da estabilidade térmica da CALB livre .....  | 52 |
| 4.5.2 Avaliação da estabilidade térmica do Imobilizados D30 e D18.....                                       | 54 |
| 5. CONCLUSÕES.....   | 57 |
| .6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....   | 57 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 59 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Composição/proporção percentual dos compostos empregados na síntese de imobilizados de diferentes densidades. ....   | 32 |
| Tabela 2- Variáveis e níveis utilizados no DCCR 22 completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em poliuretano.....  | 36 |
| Tabela 3- Massa de imobilizado, atividade e endimento do processo de imobilização da lipase nos diferentes suportes. ....  | 39 |
| Tabela 4 - Atividade residual da Lipase imobilizada em PU de diferentes densidades. ....   | 40 |
| Tabela 5- DCCR 22 completo para imobilizado de D30 .....   | 43 |
| Tabela 6- Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t(2) do DCCR 22 completo para a atividade de esterificação da enzima imobilizada em poliuretano de densidade D30 em função da massa do imobilizado e da temperatura de reação. .... | 44 |
| Tabela 7 - Análise de variância para o rendimento do imobilizado D30 do DCCR 22 completo. ....   | 44 |
| Tabela 8 – DCCR 22 completo para imobilizado de PU D18.....  | 46 |
| Tabela 9- Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t(2) do DCCR 22 completo para a atividade de esterificação da enzima imobilizada em poliuretano de densidade D18 em função da massa do imobilizado e da temperatura de reação. .... | 47 |
| Tabela 10- Análise de variância para o rendimento do imobilizado D18 do DCCR 22 completo. ....   | 47 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1- Reações catalisadas pela enzima lipase.....  | 18 |
| Figura 2- Estruturas genéricas de polímeros lineares e ramificados.....  | 22 |
| Figura 3- Estrutura geral de um poliuretano. ....  | 23 |
| Figura 4- Esquema da síntese convencional de poliuretano.....  | 23 |
| Figura 5- Esquemas das reações de alofatos e biuretos.....   | 24 |
| Figura 6- Etapas do processo de formação de uma espuma flexível.....   | 25 |
| Figura 7- Estrutura típica de uma espuma: uma célula encontrada em espuma flexível de PU, as bordas de Plateau e as respectivas áreas transversais.....              | 26 |
| Figura 8- Estrutura de ressonância do grupamento isocianato.....   | 29 |
| Figura 9- Principais reações entre isocianatos e polióis para a formação de poliuretano. ....  | 30 |
| Figura 10- Processo de Imobilização da lipase de Candida antactica B para os imobilizados in situ de densidade 30 e 20.....  | 33 |
| Figura 11- Processo de Imobilização da lipase de Candida antactica B para os imobilizados in situ de densidade 18. ....  | 34 |
| Figura 12- Mecanismo sugerido para o processo de imobilização do Lipase de Candida antarctica B.....   | 40 |
| Figura 13- Atividade de esterificação para a enzima imobilizada em poliuretano com Densidades D30 e D18 em função do tempo de reação.....                            | 41 |
| Figura 14- Atividade de esterificação da enzima imobilizada em poliuretano com densidades D30 e D18 em função da temperatura de reação.....                          | 42 |
| Figura 15- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) das variáveis no rendimento do imobilizado de densidade 30 nos experimentos do DCCR 22 completo . .... | 45 |
| Figura 16- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) das variáveis no rendimento do imobilizado de densidade 18 no DCCR 22 completo. ....                   | 48 |
| Figura 17- Número de ciclos dos Imobilizados D30, D18 e da lipase comercial Novozyme 435 com reuso contínuo. ....  | 49 |
| Figura 18- Número de ciclos do imobilizado D30 com lavagem em diferentes solventes.....  | 50 |
| Figura 19- Número de ciclos do imobilizado D18 com lavagem em diferentes solventes.....  | 51 |
| Figura 20- Estabilidade de estocagem frente e altas temperaturas para a Lipase de Candida antarctica B livre .....   | 53 |
| Figura 21- Estabilidade de estocagem frente a temperatura ambiente e de refrigerador da Lipase de Candida antarctica B livre. ....                                   | 54 |
| Figura 22- Estabilidade Térmica do imobilizado de dendidade 30.....  | 55 |
| Figura 23- Estabilidade Térmica imobilizado de dendidade 18.....   | 56 |

## LISTA DE ABREVIACÇÕES, SÍMBOLOS E UNIDADES

PU: Poliuretano

EPU: Espumas de poliuretano

D30: Densidade 30

D20: Densidade 20

D18: Densidade 18

TDI: Tolueno Dissocianato de Metila

CALB: Lipase de *Candida antarctica* B

KDa: Dalton (unidade de massa atômica)

%: Porcentagem;

°C: Graus Celsius;

μL: Microlitros;

M: molar;

mg: miligrama;

mL: Mililitros;

pH: Potencial de hidrogênio iônico;

RPM: Rotação por minuto;

U: Unidade de atividade.

# 1 INTRODUÇÃO

A lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) é a enzima mais utilizada em biocatálise, apresentando atividade para uma ampla variedade de reações de transformações, tais como: hidrólise, esterificação e transesterificação.

A sua versatilidade conduz a várias aplicações industriais, com destaque para as indústrias alimentícia (sabor e aroma), oleoquímica (síntese de ésteres), farmacêutica (explora a enantioseletividade na formulação de fármacos e resolução de álcoois racêmicos. (GOTOR FERNÁNDEZ et al., 2006), têxtil, do couro, de detergentes e do papel (HASAN et al., 2006).

Entretanto, a utilização da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) na sua forma livre é frequentemente dificultada pela desnaturação e inativação do biocatalisador durante o processo reacional, além da dificuldade para sua recuperação e reciclagem. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas, facilitar sua recuperação e a preservação da atividade catalítica ao longo de vários ciclos de reação, aumentando a relação custo-benefício (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA et al., 2004; CANTONE et al., 2012; HERNANDEZ e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

As técnicas de imobilização e as condições empregadas durante a imobilização, tipo de suporte, natureza do solvente e variações de reatores podem influenciar nas propriedades das enzimas imobilizadas.

Essas condições podem ser moldadas para modificar as propriedades da enzima imobilizada para uso em determinada reação (IDRIS e BUKHARI, 2012). Existem vários métodos para imobilização de lipases, incluindo adsorção, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e ligação cruzada (DALLA VECCHIA et al., 2004; MENDES et al., 2011a e 2011b; TORRES et al., 2011; MENDES et al., 2013).

Dentre os diversos tipos de suportes usados para imobilização de enzimas, os que têm mais se destacado nos últimos anos são os que permitem a imobilização por confinamento, com ou sem ligações, durante a etapa de síntese do suporte. Dentro deste contexto destaca-se como suporte o poliuretano (PU). Estudos recentes desenvolvidos pelo grupo de pesquisa demonstraram o potencial do PU na imobilização *in situ* de lipases durante a sua síntese (polimerização). As lipases imobilizadas em PU reticulado/ramificado apresentaram excelentes resultados de rendimento, estabilidade

térmica e reciclos (NYARI, 2013). Considerando que diferentes tipos (ramificado ou linear) de materiais poliméricos de PU podem ser sintetizados em função dos monômeros (polióis e isocianatos) utilizados e do método de polimerização empregado (PALASKAR et al. 2010; VILAR, 2004; PECHAR, et al., 2007) torna-se necessário investigações complementares visando melhor compreender os efeitos dos mecanismos de polimerização sobre a eficiência do processo de imobilização de lipase em PU.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi Imobilizar Lipase B de *Candida antarctica* em espuma flexível de poliuretano de diferentes densidades.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito da densidade sobre o processo de imobilização e o rendimento de imobilização;
- Avaliar os efeitos da massa de catalisador e temperatura sobre a atividade de esterificação;
- Avaliar a estabilidade a estocagem em diferentes faixas de temperaturas;
- Avaliar a estabilidade operacional (reciclos) e o efeito do tratamento prévio após cada ciclo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão abordados temas referentes às lipases, com foco na lipase de *Candida antarctica* B. Quais as reações de síntese que essas enzimas catalisam, além disso, como esse biocatalisador tem sua eficiência aumentada quando imobilizada. Também serão abordados os poliuretanos, incluindo o seu histórico, com foco nas espumas flexíveis e sua versatilidade, as reações envolvidas nas suas sínteses, os fatores que favorecem uma boa espumação e a sua aplicação como suporte para imobilização de biomassa.

### 2.1 LIPASES

Amplamente distribuídas na natureza, as lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, as leveduras *Tulopis sp* e *Candida sp* e as bactérias *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp.*, sendo que as características da lipase variam em função da sua origem. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases provenientes de micro-organismos são preferíveis às de fontes animais e plantas, devido ao elevado custo de isolamento vinculado a estas fontes (CASTRO et al., 2004; DUMITRIU et al., 2003).

As lipases (triglicerolacil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. A diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água (SARDA e DESNUELLE, 1958). Em síntese, a diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato da primeira catalisar reações de substratos insolúveis

em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (ALVAREZ - MACARIE et al., 1999).

Entretanto, a maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e não requerem cofator (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005), apresentando temperatura ótima entre 30 e 60°C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (MACRAE; HAMMOND, 1985, BATISTELLA, 2012; FREITAS, 2006), sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (KIRK e CHRISTENSEN, 2002; SHARMA et al., 2001).

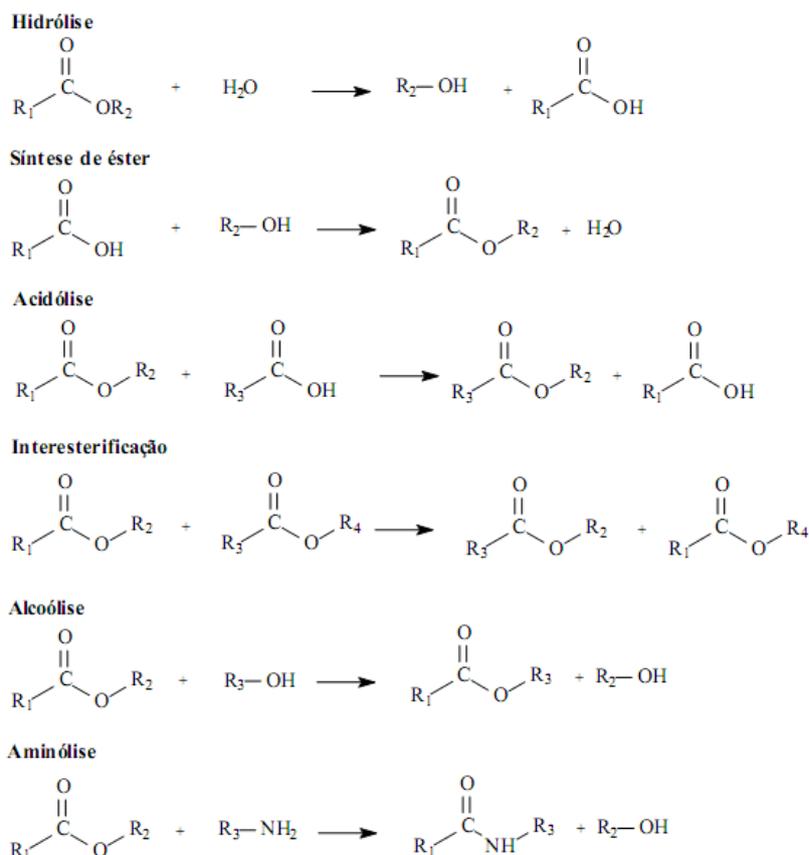
As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas. Seu ponto isoelétrico (PI) varia em uma faixa de pH entre 3,6 e 7,6 e a maioria delas possui PI (ponto isoelétrico) em pH entre 4 e 5.

A pesquisa nesta área busca a descoberta de enzimas mais eficientes que as atuais, com atividades para novos compostos alvo, além de novos suportes sólidos, 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)

As enzimas sendo utilizadas como catalisadores vem contribuindo para o rápido crescimento da área de síntese orgânica, onde as lipases são muito utilizadas devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente ampla, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação (Figura 1) em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar, com alta especificidade.

O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas para aplicações industriais (PANDEY et al., 1999; GANDHI et al., 1997).

**Figura 1- Reações catalisadas pela enzima lipase.**



Fonte: VILLENUEVE et al., 2000.

Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica de lipases, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização ou modificações na estrutura nativa da enzima, sendo que estes processos envolvem diferentes graus de complexidade e eficiência.

Os métodos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte (FABER, 1997). A engenharia genética de lipases envolve a modificação do gene que codifica a enzima. Esta tecnologia inclui a habilidade de isolar e expressar os genes de interesse e modificar algum aminoácido que ocupe um sítio importante para a atividade catalítica da enzima (VILLENUEVE et al., 2000; WINLKER e GUBERNATOR, 1994).

### 2.1.1 Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL B)

A lipase CAL B tem sido estudada para potenciais aplicações na indústria alimentícia, de detergente, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e oleoquímica (HASAN et al., 2006). Estas aplicações são possíveis devido à sua ampla gama de especificidade para substratos, alta atividade para várias reações sob condições brandas, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica, atuação em uma faixa ampla de pH e elevada estereoespecificidade (MCCABE et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008; DENG et al., 2011). Além disso, é utilizada em reações de transesterificação, hidrólise em água, esterificação de solventes orgânicos, transformações enantio e regioseletiva de muitos polímeros (HASEGAWA et al., 2008; LASSALLE e FERREIRA, 2008; SCHWAB et al., 2008). Apresenta também características biocatalíticas pendentes para a conversão estereosseletiva de álcoois secundários, provavelmente devido ao espaço limitado disponível na sua bolsa hidrofóbica, desempenha um importante papel na síntese de glicolípídeos (PALOMO et al., 2002 ; UPPENBERG et al., 1994).

A lipase CAL B não apresenta ativação interfacial, sendo o acesso ao sítio ativo feito por um canal estreito com uma particularidade, há existência de uma pequena hélice de elevada mobilidade perto deste.

A principal aplicação industrial da CAL B na forma livre ou imobilizada são: produção de compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica (STRAATHOF et al., 2002); alimentos e fármacos (CASTRO et al., 2004); produção de ésteres usados na indústria de aromas (BRÍGIDA et al., 2008; LOZANO et al., 2002); síntese de oleato de cetila (aplicado em indústrias de cosméticos) e biodiesel (SILVA et al., 2012); síntese de lactato de butila (éster utilizado em indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica por possuir propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes) (PIROZZI e GRECO, 2004); síntese de ésteres de vitaminas (a fim de torná-las solúveis em óleo para adição em produtos alimentícios) (MAUGARD e LEGOY, 2000) e outras como esterificação de açúcares e glicidol (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2003; PALOMO et al., 2005).

## 2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador, passível de recuperação, com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros (CRUZ JÚNIOR, 2007).

Segundo Van Beynum (1980), enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de sua capacidade catalítica, e que podem ser utilizadas repetida e continuamente. Elas podem ser aplicadas tanto em catálise heterogênea como também em métodos analíticos, como adsorventes seletivos de proteína, como micro-dispositivo para recuperação controlada de proteínas entorpecentes ou mesmo como ferramenta fundamental na química de proteínas na fase sólida (CAO, 2009). Todavia, a maior aplicação se dá na catálise heterogênea, sendo hoje, devido aos avanços da tecnologia de imobilização, equivalentes o número de processos que fazem uso tanto de enzimas livres quanto de enzimas imobilizadas (STRAATHOF et al., 2002).

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e, frequentemente, inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização (CARVALHO et al., 2006).

Além do tipo de imobilização, vários parâmetros importantes devem ser analisados para a escolha do suporte como: a estabilidade química e física, o caráter hidrofóbico/hidrofílico, a capacidade de ligação com a enzima (SILVA et al., 2009).

No que diz respeito à imobilização de lipase de *Candida antarctica* tipo B, considerando que esta é uma das poucas lipases que não sofre o fenômeno de ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998), tem-se observado que a imobilização em suportes hidrofóbicos não apresentam hiper-ativação da enzima imobilizada. Há indícios de que o uso de suportes altamente hidrofóbicos pode, em algumas

circunstâncias, reduzir a eficiência de imobilização da Lipase de *Candida antarctica* B. (BRÍGIDA, 2006).

## **2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**

Apesar do grande número de trabalhos publicados na área de imobilização enzimática, poucos processos são aplicados em escala industrial. Assim, para que o emprego de enzimas imobilizadas torne-se um processo economicamente viável, deve – se considerar o tipo de suporte empregado. Neste contexto, a espuma flexível de poliuretano apresenta-se como um suporte para imobilização inovador e de eficiência considerável, em relação a outros suportes relatados na literatura.

### **2.3.1 Poliuretanos (PU'S)**

O conhecimento da reação de produção de ligações uretânicas datada de 1849, quando Wurts e Hofmann relataram pela primeira vez a reação entre o isocianato e um composto contendo grupos hidroxila (SOARES, 2012). Em seguida, Otto Bayer et al. (1937), utilizaram essa reação para o desenvolvimento de PU's, reagindo um diisocianato com glicóis, resultando em reação de poliadição (VILAR, 2004).

As primeiras produções de espumas poliuretânicas ou de poliuretano (EPU's) foram realizadas por Leverkusen entre 1952 e 1954, utilizando poliéster como poliois, dando origem as primeiras espumas e assim desenvolvendo a base para tecnologia comercial de espumas. Em 1957 iniciou-se a utilização de poliois poliésteres e por causa de suas vantagens técnicas e comerciais, estes novos poliois ganharam rapidamente espaço no mercado das espumas de PU (SOARES, 2012).

Os PU's são polímeros versáteis devido à variedade dos grupos constitutivos e da possibilidade de polimerização controlada, o que permite a adaptação do processo e composição (PU pode conter grupamentos: aromáticos, alifáticos, cíclicos, amidas, uréia, éteres, ésteres entre outros) para a obtenção de materiais para as mais variadas exigências, desde a sola de calçados a implantes cirúrgicos (ZECK, 2004).

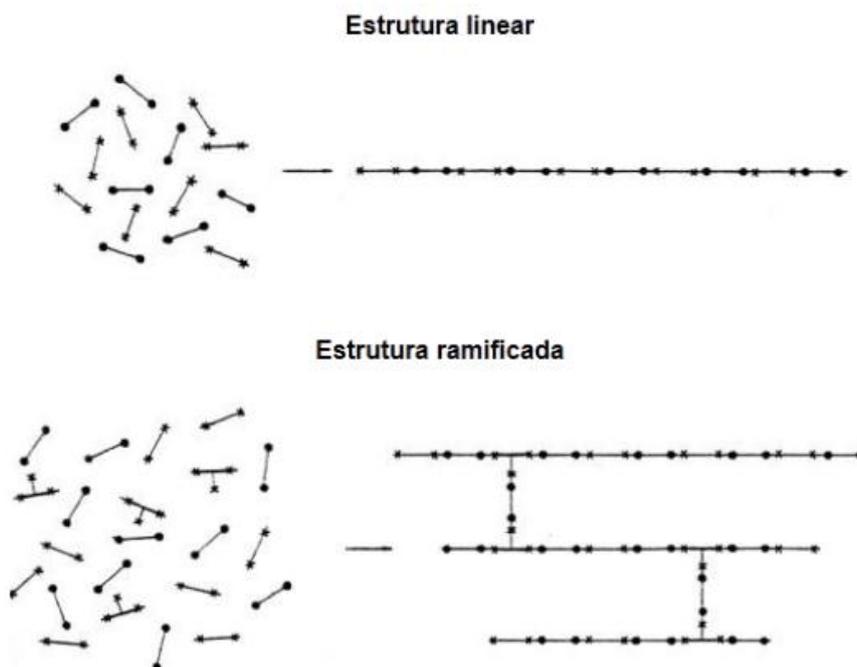
A classificação das espumas como flexível ou rígida, depende principalmente da escolha do polioli. As flexíveis são preparadas a partir de poliois de massa molecular moderadamente elevada, variando de 100 a 6000 e baixo grau de funcionalidade, variando de 1,8 a 3, ao contrário das espumas rígidas, cujos pólios apresentam massas

moleculares entre 250 a 1000 e alta funcionalidade de 3 a 12 (HERRINGTON e HOCK, 1997; VILAR 2004).

### 2.3.2 Síntese das espumas de poliuretanos

A síntese de diferentes tipos de materiais poliméricos é dependente dos monômeros (polióis e isocianatos) utilizados e do método de polimerização empregado (PALASKAR et al. 2010). Os pólios e isocianatos usados para síntese podem variar quanto a massa molar, natureza química e funcionalidade (VILAR, 2004). Se a funcionalidade de ambos os reagentes é igual a 2, então um PU linear será produzido. No entanto, se um ou ambos os reagentes têm uma funcionalidade média superior a 2, um polímero ramificado (Figura 2) será formado (PECHAR et al., 2007).

**Figura 2-** Estruturas genéricas de polímeros lineares e ramificados.



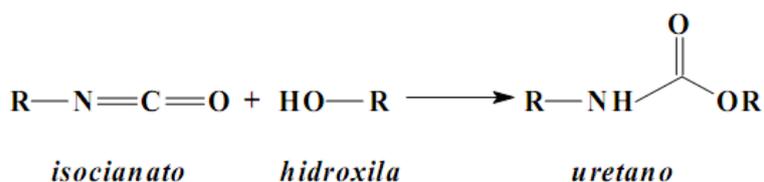
Fonte: VILAR, 2004

Além dos polióis e isocianatos, são usados outros reagentes para a síntese de poliuretanos, tais como: extensores de cadeia (polióis geralmente de cadeias menores) e catalisadores para aumentar a velocidade de reação e estabelecer o balanço apropriado entre a extensão da cadeia e a reação de formação de polímero. Surfactantes e agentes

de expansão por controlarem o processo de formação e a densidade do polímero também são importantes na produção dos PUs (FERREIRA, 2003).

Ao contrário da maioria dos polímeros, cujas unidades monoméricas são bem definidas, o poliuretano é um polímero que não apresenta unidades repetitivas (uretano) de forma regular, não possuindo assim, uma fórmula empírica representativa da macromolécula. Usualmente, representa-se o poliuretano por suas unidades monoméricas principais, o di-isocianato e o poliol, não sendo representados todos os tipos de ligação que efetivamente podem fazer parte da estrutura do polímero formado. A estrutura geral que constitui a base da química desses polímeros é a ligação uretânica mostrada na Figura 3 (SOARES, 2012).

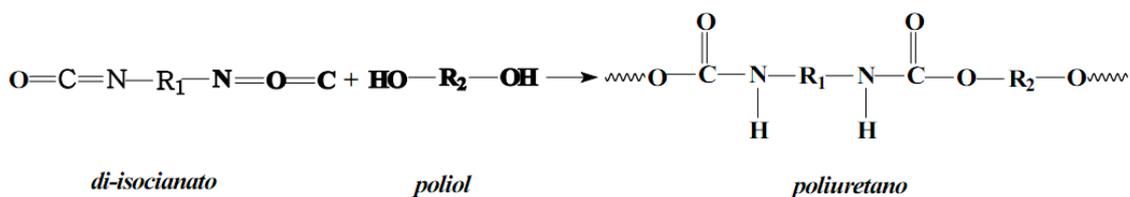
**Figura 3-** Estrutura geral de um poliuretano.



Fonte: VILAR, 2004

As principais reações de síntese dos PU's envolvem a reação de adição entre um isocianato e um composto que possui hidrogênio ativo, normalmente um poliol, responsável pela formação de ésteres de ácido carbâmico (ligações uretano) e pode ser considerada como a reação de propagação da cadeia poliuretânica, conforme esquema da Figura 4.

**Figura 4-** Esquema da síntese convencional de poliuretano.



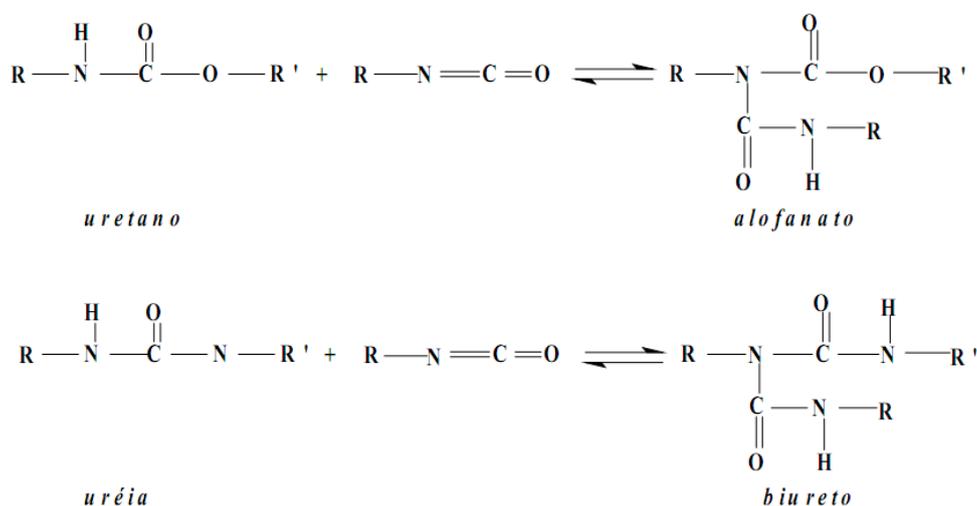
Fonte: VILAR, 2004

Já as espumas PU podem ser definidas como uma classe de polímeros que durante a reação de polimerização, apresentam dispersão de gás dando origem à

formação de pequenos bulbos ou células, interligadas em uma estrutura tridimensional. (SOARES, 2012)

Durante a síntese, devido a reação de polimerização ser exotérmica, ocorrem reações secundárias, nas quais as ligações uretânicas reagem com os isocianatos, formando as ligações alofanatos (Figura 5), que se formam em temperaturas entre 120 °C e 150 °C, e ligações de biuretos, formados entre 100°C e 150°C, aumentando as ramificações e as reticulações da matriz polimérica. Por serem menos estáveis que as ligações uretânicas, acima de 150 °C essas ligações são degradadas nos compostos iniciais. Normalmente é utilizado excesso de isocianato para a formação dessas ligações e garantir maior grau de reticulação nas EPU's. (SOARES, 2012).

**Figura 5-** Esquemas das reações de alofanatos e biuretos.



Fonte: VILAR, 2004.

As propriedades dos PU's estão intimamente ligadas à morfologia apresentada pelo polímero. Devido às fortes interações entre as ligações uretânicas, segmentos rígidos de caráter polar são formados dentro de uma matriz flexível de caráter apolar, formada pela cadeia principal do polioliol utilizado, denominado de segmento flexível. Dessa forma, os constituintes da matriz tornam-se termodinamicamente incompatíveis, como consequência surgem domínios distintos, resultando numa separação de fases (YILGOR et al., 2006; VILAR, 2004).

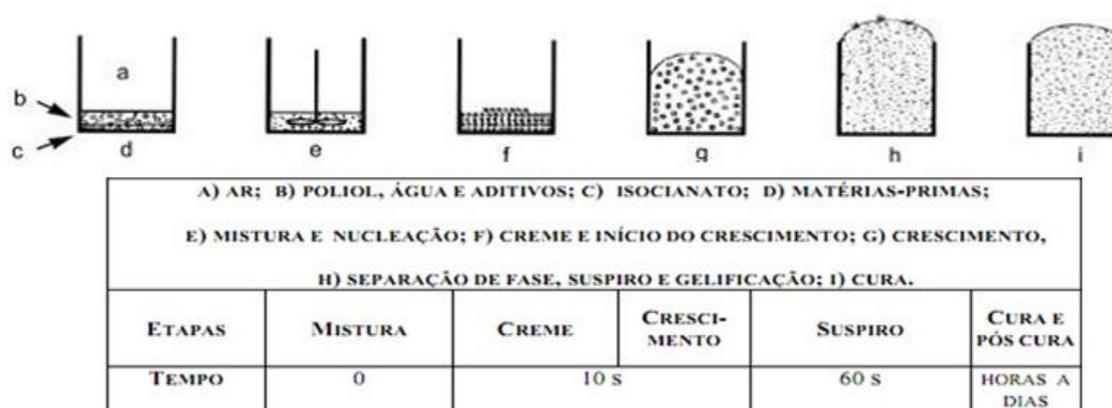
Por outro lado, na tecnologia de espumas, a formação da poliuréia, devido à reação da água com o isocianato, desempenha um papel importante na formação da estrutura de células abertas e na separação das macro/microfases na matriz. Devido às fortes interações entre as ligações da uréia, promovidas pelas pontes de hidrogênio,

formam-se facilmente agregados de vários tamanhos, denominados de esferas de poliuréias, que interagem com os segmentos rígidos da matriz, contribuindo para o aumento do grau de reticulação e da segregação das fases do polímero, induzindo à abertura das células da espuma (LAN e HAUGSTAD, 2011).

Do ponto de vista químico existem dois métodos principais de preparação dos poliuretanos.

No primeiro, todos os reagentes são misturados em uma única etapa (*ones hot process*). O segundo inclui a preparação de um pré-polímero de baixa massa molar, seguida de extensão da cadeia deste pré-polímero, gerando uma elevada massa molar. A formação deste precursor se dá através da reação entre macropoliol e um diisocianato em excesso, originando pré-polímeros com cadeias contendo grupamento isocianato livre em suas extremidades. A extensão das cadeias do pré-polímero se passa com a adição de compostos contendo grupamento hidroxilas (menores cadeias) que reagem com os grupamentos isocianato das pontas das cadeias do pré-polímero. Esta última reação dá origem aos segmentos rígidos, responsáveis pela coesão das cadeias destes polímeros. Os segmentos flexíveis, por sua vez, são constituídos pelas cadeias do macropoliol (ALMEIDA e AKCELRUD, 1999). O processo de formação do poliuretano flexível está representado na Figura 6.

**Figura 6-** Etapas do processo de formação de uma espuma flexível.



Fonte: VILAR, 2004.

Na fase inicial da formação de uma espuma flexível há um pequeno crescimento das cadeias e não há formação detectável de biureto e alofanato (grupos relacionados à formação de nós em uma rede poliuretânica). Simultaneamente a concentração do gás carbônico aumenta no interior das microbolhas formadas durante a etapa de

homogeneização (nucleação) e a massa da espuma começa a expandir em volume. O gás difunde das bolhas menores, de maior pressão interna, para as bolhas maiores de menor pressão, causando um crescimento das bolhas maiores e um consumo das bolhas menores.

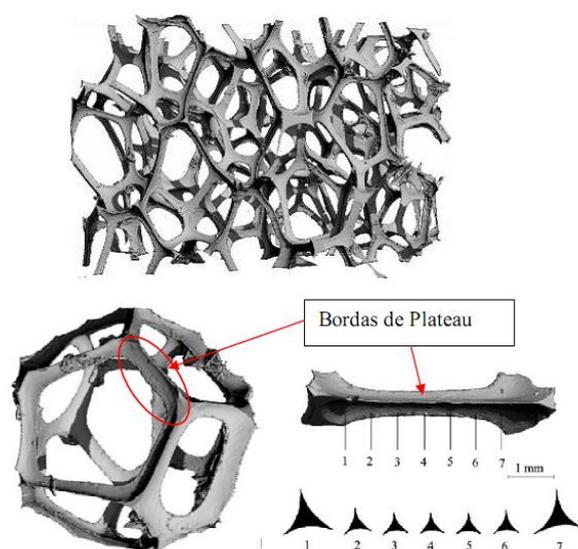
As bolhas formadas na etapa de nucleação são muito pequenas e quase esféricas, mas conforme elas expandem, tendem a se alongar na direção das paredes da espuma (VILAR, 2004; JANG et al., 2008).

Quando volume da mistura reativa torna-se pequeno em comparação ao volume das bolhas em expansão, a área de contato entre as bolhas adjacentes torna-se uma estrutura triangular chamada tecnicamente de bordas de Plateau (Figura 7).

O líquido é transferido das membranas para as bordas de Plateau por fluxo capilar, levando a formação das células poliédricas irregulares, que se aproximam da forma de um octaedro truncado.

Pode-se concluir que as características físico-químicas da espuma são influenciadas pela morfologia macroscópica da espuma (células) e pela morfologia microscópica do polímero (estrutura flexíveis e rígidas), sendo muito difícil separar o efeito de cada um desses grupos morfológicos nas características finais do produto (SOARES, 2012).

**Figura 7-** Estrutura típica de uma espuma: uma célula encontrada em espuma flexível de PU, as bordas de Plateau e as respectivas áreas transversais.



Fonte: JANG et al., 2008.

A escolha da matriz para imobilização é um dos pontos chave na aplicação de biomassa imobilizada. Para que um material possa ser usado como suporte, deve-se levar em consideração, entre outros fatores, a resistência no meio que este interage, isto é, o suporte deve ser pouco ou muito pouco solúvel no meio, principalmente nas condições de operação. Já a estrutura do suporte é extremamente importante, principalmente a superfície de contato, quando este é destinado para a imobilização por adsorção.

Entre muitos suportes disponíveis para imobilização de células microbianas, a técnica usando partículas porosas para suporte de biomassa, apresenta vantagens sobre outros métodos em termos de aplicação industrial, tais como ausência de aditivos químicos, de assepsia, sendo que as partículas podem ser reutilizadas e são resistentes a cisalhamento (DIAS et al, 2001; DE ORY et al, 2004).

Entre as matrizes utilizadas no processo de imobilização, as espumas de poliuretanos tem se destacado devido às seguintes características: grande área superficial com interstícios para o crescimento celular, porosidade uniforme garantindo a troca gasosa, fluxo de substrato e produtos metabólicos, boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica, resistência à degradação enzimática além de proporcionarem imobilização fácil e viável para uso em escala industrial.

Além dessas características a espuma de poliuretano se revela como suporte promissor devido a sua flexibilidade de síntese, sendo possível obter espumas hidrofílicas e hidrofóbicas, o que facilita sua utilização em processos biocatalíticos conduzidos em meio orgânico ou aquoso. Dependendo do sistema reacional é possível aproveitar a característica de sorção das espumas flexíveis a fim de promover a transferência de massa dos substratos até o micro-organismo, conforme foi relatado por Oh, Maeng e Kim (2000).

### **2.3.3 Reagentes para síntese de poliuretano**

Nos processos de fabricação de espumas flexíveis são utilizadas diferentes matérias-primas, como polióis, isocianatos, água, catalisadores, surfactantes, agentes de expansão auxiliares, retardantes de chama, pigmentos, cargas, etc.

### **2.3.3.1 Polióis**

Os poliois são uns dos grandes responsáveis pelas diversas propriedades dos poliuretanos e a sua versatilidade como polímeros em diversas áreas da ciência. O termo polioliol abrange uma grande variedade de compostos contendo grupos hidroxilas, capazes de reagir com os isocianatos para formar os PU's. Os poliois mais simples encontrados para as sínteses de poliuretanos são os glicóis como 1,4-butanodiol e 1,6-hexanodiol, que por possuírem baixa massa molar resultam em segmentos poliméricos rígidos devido a alta concentração de grupos uretânicos por unidade de cadeia do polímero (VILAR, 2004; SERVE, 2007).

Diversos tipos de polióis são empregados na fabricação dos diferentes tipos de espumas flexíveis de PU. Destes, os principais são os polióispoliéteres e polióis poliméricos de diferentes estruturas, usados nas espumas convencionais e de alta resiliência, e ainda, os polióis poliésteres, óleo de mamona e outros polióis obtidos a partir de óleos vegetais. Neste estudo de imobilização enzimática, o polioliol empregado no processo de polimerização foi o polioliol poliéster.

### **2.3.3.2 Polióis poliésteres**

As propriedades das espumas flexíveis dependem da estrutura química do polioliolpoliéster utilizado, como funcionalidade, tamanho da cadeia e tipo de epóxido empregado. Os epóxidos poliésteres normalmente têm funcionalidade entre 2 e 3, peso molecular entre 3000 e 6000, correspondendo a pesos equivalentes entre 1000 e 2000, e são obtidos pela reação de um triol (ex. glicerina) com óxidos de propileno ou etileno. Os polióis poliésteres produzidos com óxido de propileno são os mais utilizados. A quantidade e posição do óxido de etileno na cadeia do polioliol tem grande influência nas suas propriedades, e o óxido de etileno pode estar distribuído ao acaso ou em blocos. O teor de óxido de etileno presente nos polióis poliésteres varia entre 5% e 15% e o aumento do teor desses resulta em maior hidrofobicidade do polioliol.

Existem também polióis poliésteres destinados a produção de espumas poliuretânicas, dos quais os mais utilizados são os poliadipatos glicóis, normalmente a base de dietileno glicol e trimetilol propano, com massa molecular de 1.500 a 3.000, funcionalidade entre 2 e 2,5 e número de OH entre 58-62 mg de KOH/g. As propriedades das espumas dependem da estrutura do polioliol poliéster usado, sendo que a

adição de polioli poliéster altamente ramificado leva à obtenção de espumas rígidas (VILAR, 2004; THOMSON, 2005).

### 2.3.3.3 Isocianatos

O isocianato mais utilizado nas espumas flexíveis em bloco é o tolueno diisocianato (TDI) na mistura de isômeros 2,4 e 2,6, nas proporções 80:20 (TDI 80) ou também 65:35 (TDI 65). O TDI 80/20 cru é usado na fabricação de espumas flexíveis de alta resiliência. A relação estequiométrica entre as quantidades de isocianato e as de polioli e água utilizadas é chamada de índice 100, sendo normalmente usado um excesso de 5% a 25% de TDI (índice de 105 a 125). Este excesso resulta na formação de ligações cruzadas alofanato e biureto, acarretando aumento do suporte de carga, e diminuição da tensão de ruptura, alongamento e deformação permanente. Como a acidez diminui a reatividade do TDI deve ser controlada (SANTOS, 2009).

Algumas propriedades físicas das espumas sofrem a influência da relação entre os isômeros de TDI utilizados, devido à diferença de reatividade entre os dois grupos NCO presentes nas posições 2 e 4 do anel aromático dos isômeros. Quando se aumenta o teor do TDI com composição 65/35 (quantidade de grupos OH nos dois monômeros empregados na mistura de síntese) a reação do isocianato com a água é favorecida e ocorre maior liberação de gás e calor, e devem ser efetuados ajustes na catálise por causa da menor reatividade do TDI 65/35 com os polióis (SANTOS, 2009).

A estrutura eletrônica do grupo isocianato indica que são possíveis as estruturas de ressonância da Figura 8.

**Figura 8-** Estrutura de ressonância do grupamento isocianato.



Fonte: VILAR, 2004.

Nos PUs a maioria das reações dos isocianatos ocorre através da adição à dupla ligação C=N. Um centro nucleofílico contendo um átomo de hidrogênio ativo ataca o carbono eletrofílico e o átomo de hidrogênio ativo é então adicionado ao nitrogênio. Grupos aceptores de elétrons, ligados ao grupamento NCO, aumentam sua reatividade e os doadores a reduzem, e por isso, os isocianatos aromáticos são mais reativos do que os alifáticos.



sobre a reação de polimerização, enquanto que as amins terciárias catalisam a reação entre o isocianato e a água, regulando a formação da espuma (VILAR, 2004).

O balanço entre os teores utilizados de catalisadores de gelificação (dioctoatoestano) e de expansão (amina terciária) é muito importante nas características das espumas. Quando se usa baixa concentração de catalisador de estanho, o polímero demora muito a gelificar. Por outro lado, o excesso de catalisador de estanho torna o polímero demasiadamente forte e resistente à pressão interna dos gases. Como consequência as paredes celulares não são rompidas e a espuma terá células fechadas e encolherá.

#### **2.3.3.5 Surfactantes**

É essencial utilizar um agente tensoativo para controlar o processo de formação da espuma. Os surfactantes de silicone exercem uma função chave como emulsificante e estabilizadores da espuma, sendo os poliésteres polisiloxanos os mais usados.

Os surfactantes de silicone baixam a tensão superficial permitindo a introdução, na mistura, do ar que irá formar os núcleos das células da espuma. Todavia, o excesso de surfactante de silicone estabiliza demais o sistema e pode evitar a abertura das células (SANTOS, 2009).

#### **2.3.3.6 Agentes de expansão**

O controle da densidade das espumas flexíveis é feito principalmente através das quantidades empregadas de água e agentes de expansão auxiliares. O uso de água como agente de expansão resulta na formação de segmentos rígidos de poliuréia e conseqüentemente o aumento da dureza da espuma. Os agentes de expansão auxiliares, como o cloreto de metileno, acetona e CO<sub>2</sub> são utilizados para a obtenção de espumas de baixa densidade, mais macias (VILAR, 2004).

À medida que a reação exotérmica de polimerização ocorre, a temperatura aumenta rapidamente e a mistura vai ficando cada vez mais viscosa e rígida, devido à formação do polímero. Os agentes de expansão, no início da reação, escapam da mistura com o aumento da temperatura. Porém, a partir de certa viscosidade, os gases misturados ou formados na reação não conseguem mais escapar da mistura reacional, formando, então, as cavidades (JANG et al., 2008).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ENZIMA E PRODUTOS QUÍMICOS

A enzima utilizada foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ). Os monômeros, surfactantes, extensores de cadeia e água para as diferentes densidade de estudo, foram cedidas pela empresa Tasca Estofados e Cia (empresa produtora de espuma flexível de poliuretano). Os solventes utilizados foram hexano P.A. (Quimex, 97% de pureza), metanol P.A. (Quimex, 97% de pureza) e etanol P.A. (Quimex, 97% de pureza).

#### 3.2 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Para o procedimento experimental de imobilização da enzima *Candida antarctica* B (CAL B) em espuma flexível de PU foram avaliadas três densidades diferentes (D30, D20 e D18), obtidas variando a proporção entre os monômeros, surfactante, extensor de cadeia e água (Tabela 1).

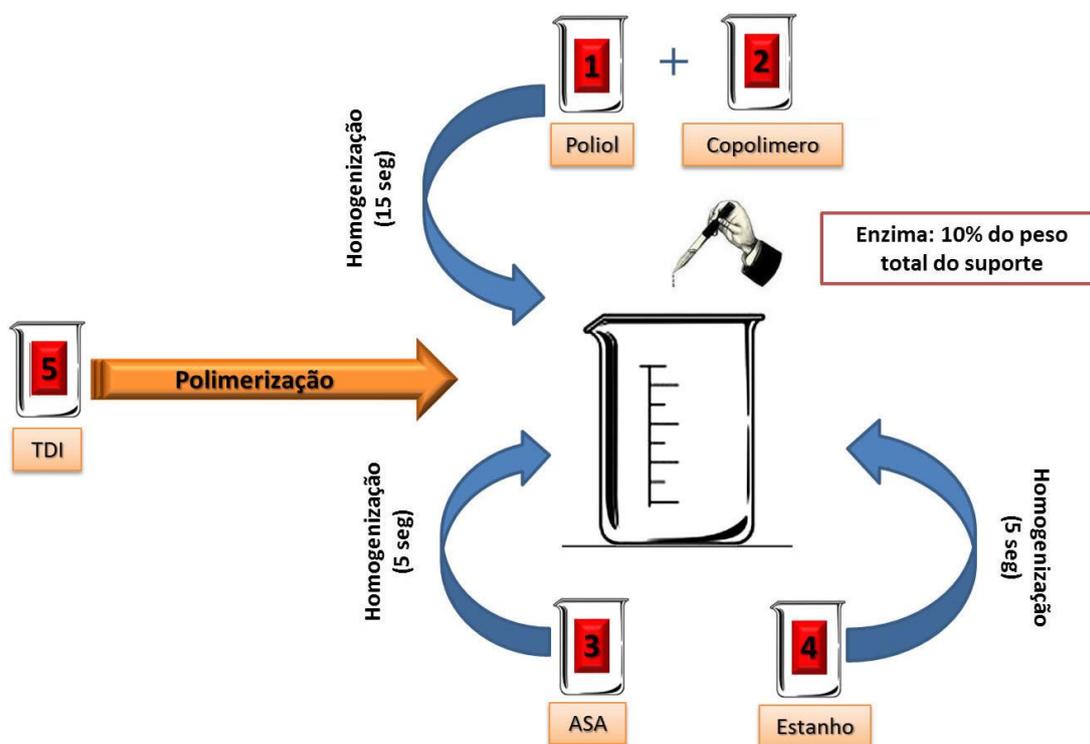
**Tabela 1-** Composição/proporção percentual dos compostos empregados na síntese de imobilizados de diferentes densidades.

| Densidade | Proporção percentual (%) |             |                    |       |
|-----------|--------------------------|-------------|--------------------|-------|
|           | monômeros                | surfactante | extensor de cadeia | água  |
| D18       | 58,71                    | 0,98        | 37,98              | 2,35  |
| D20       | 57,35                    | 0,76        | 37,55              | 2,86  |
| D30       | 68,85                    | 0,6         | 28,47              | 1,95, |

A enzima foi empregada na forma de uma solução aquosa, contendo 2 g em 20 mL de água destilada. O imobilizado foi produzido empregando um volume de extrato enzimático correspondente a 10 % do volume total dos monômeros, ou seja, 6 mL de solução enzimática. O processo de imobilização da *Candida antarctica* B em espuma flexível de PU de densidade 30 e 20, inicia com a mistura dos monômeros (poliol e copolímero) em um béquer, os quais são homogeneizados por 15 segundos. Em seguida é adicionada a solução enzimática, seguida de nova homogeneização. Após é incorporado, de forma concomitante, a mistura, a ASA (amina, silicone e água) e o

estanho. Por fim é vertido ao béquer o isocianato, o qual dará início ao processo de polimerização (Figura 10).

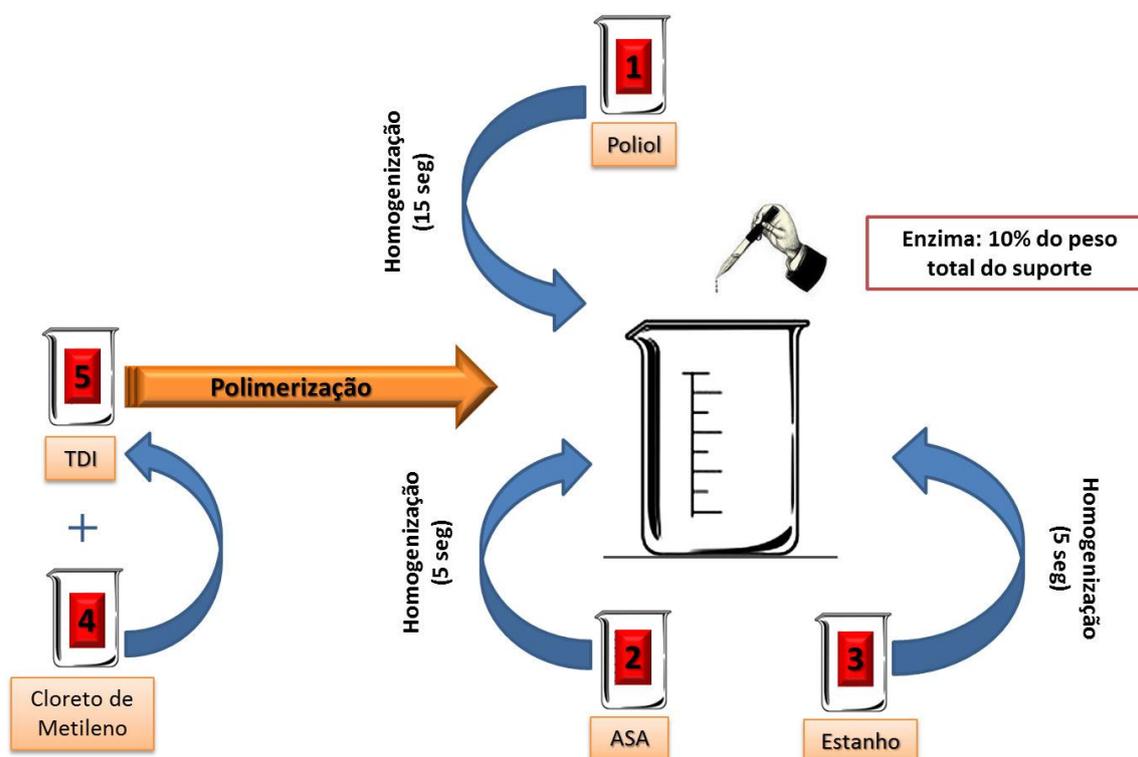
**Figura 10-** Processo de Imobilização da lipase de *Candida antactica* B para os imobilizados *in situ* de densidade 30 e 20



A mistura completa é polimerizada em forma de alumínio previamente untada com vaselina sólida. Para o poliuretano de espuma flexível de densidade 18 o processo de formação ocorre seguindo os mesmos princípios dos PU's de densidade 30 e 20, sem o emprego do copolímero como parte da composição desse imobilizado. Além desse diferencial, na etapa final do processo de mistura das substâncias formadoras do poliuretano, faz-se necessário a incorporação de cloreto de metileno para o PU D18 (Figura 11).

A expansão da espuma e a completa polimerização da mesma ocorrem em aproximadamente 1 minuto, possibilitando visualizar algumas características da espuma formada, como conformação, flexibilidade, maciez, firmeza, porosidade interna e resistência (ZAIAT, 1996; LUCAS et al., 2001; SANTOS, 2011).

**Figura 11-** Processo de Imobilização da lipase de *Candida antactica* B para os imobilizados *in situ* de densidade 18.



Cabe ressaltar que o método de imobilização utilizado nesta pesquisa consiste no método de encapsulamento, onde ocorre a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, realizando o “confinamento” da proteína no polímero insolúvel, resultando no biocatalisador imobilizado (DALLA-VECCHIA et al., 2004; GONÇALVES, 2007).

### 3.2.1. Rendimento do processo de imobilização

O rendimento do imobilizado foi calculado considerando a atividade total da enzima livre em solução ofertada ao sistema (a qual considera o volume de extrato enzimático empregado no ensaio de imobilização e atividade da enzima livre (U/mL)) e a atividade total presente no imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido e atividade do imobilizado (U/g)) de acordo com a Equação 1 (BRÍGIDA, 2006).

$$RI (\%) = \frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_0} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

RI (%) = Rendimento de imobilização

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

$U_0$  = atividade da solução enzimática oferecida para imobilização

### **3.3 INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO IMOBILIZADO PARA UMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO**

A fim de avaliar como os parâmetros tempo e temperatura influenciam na atividade enzimática foram conduzidas reações de esterificação em diferentes tempos e temperaturas reacionais. O meio reacional empregado foi uma mistura de ácido oleico e etanol, na razão molar 1:1, sendo a atividade quantificada volumetricamente, conforme método titulométrico descrito no item 3.7.

Todos os ensaios foram conduzidos empregando 0,1g do imobilizado (enzima + PU) e 5 mL de meio reacional. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm.

A variável tempo foi avaliada a 40°C, por um período de até 100 minutos. A partir dos resultados anteriores, para a variável temperatura estipulou-se um tempo reacional de 40 minutos. As temperaturas avaliadas foram de 20, 40 e 60°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.4 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MEDIDA DE ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO LIPASE *Candida antarctica* B (CALB) IMOBILIZADA EM POLIURETANO (PU).**

Em função dos resultados obtido na escolha do suporte, optou-se por dar continuidade ao trabalho utilizando os PU de densidade 30 e 18 e a fim de otimizar o processo reacional de esterificação para esses imobilizados, foi realizado um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> completo (DCCR) variando a massa de imobilizado e a temperatura reacional, conforme apresentado na Tabela 2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

**Tabela 2-** Variáveis e níveis utilizados no DCCR 2<sup>2</sup> completo na medida de atividade de esterificação para a enzima imobilizada em poliuretano.

| Variáveis Independentes*   | Códigos        | Níveis |      |     |      |        |
|----------------------------|----------------|--------|------|-----|------|--------|
|                            |                | -1,41  | -1   | 0   | +1   | 1,41   |
| Massa do imobilizado (g)   | X <sub>1</sub> | 0,0295 | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,1705 |
| Temperatura da reação (°C) | X <sub>2</sub> | 18,85  | 25   | 40  | 55   | 61,15  |

\*Variáveis Independentes Fixas: tempo de reação 40 mim.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO RECICLO OPERACIONAL DOS IMOBILIZADOS D30 E D18

A capacidade de ciclos reacionais, também conhecida como estabilidade operacional do reuso, dos imobilizados foi avaliada considerando a atividade racional para síntese do oleato de etila, empregando as condições experimentais descritas no item 3.3. Foram empregadas duas metodologias distintas:

*a) reuso modo contínuo:* após a reação de esterificação (40 minutos), o imobilizado foi separado do meio reacional (ácido oleico e etanol) por centrifugação (MPW - Centrifuge). O sobrenadante foi removido para análise da atividade e o imobilizado foi adicionado em um novo meio reacional para uma nova reação (40 minutos). Este procedimento foi repetido até a atividade residual da enzima atingir 50% da atividade inicial (FICANHA, 2014).

*b) reuso a cada 24 horas com lavagem:* após a reação de esterificação (40 minutos) o meio reacional (ácido oleico e etanol) foi removido do sistema com micropipeta automática (Transferpette S), e submetido a análise de atividade, enquanto o imobilizado era submetido a lavagens com solventes orgânicos (hexano, metanol, etanol e meio reacional). Após 1 minutos de contato com o solvente, o sistema era submetido a uma etapa de centrifugação (5000 rpm por 3 minutos) para separação das fases. O sobrenadante era descartado e o imobilizado armazenado em estufa a 40 °C por 24 horas (para a completa evaporação dos solventes orgânicos residuais empregados na lavagem) antes de ser submetido a um novo meio reacional (ciclo reacional). Os procedimentos foram repetidos até o imobilizado atingir uma atividade residual igual a 50 % da atividade inicial.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

Foram avaliadas três faixas de temperatura de estocagem para os imobilizados de densidade D30 e D18: *i*) temperatura ambiente (entre 10 e 30°C), *ii*) temperaturas elevadas (40, 60 e 80 °C) e *iii*) baixas temperaturas (entre 2 e 5°C). Para a última empregou-se uma geladeira (Electrolux – Super freezer DC9A).

Como resposta acompanhou-se a atividade para a síntese do oleato de etila nas condições descritas no item 3.3. Os ensaios foram realizadas periodicamente (no início diariamente e depois semanalmente), sendo a estabilidade expressa em termos de atividade residual em relação à atividade do dia da síntese (tempo 0).

### 3.7. ATIVIDADE ENZIMÁTICA- ESTERIFICAÇÃO

A atividade de esterificação foi quantificada através de uma reação de síntese, empregando o ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) como reagentes ((Bernardes et al.,(2007) e Langone et al., (2002)). Após a realização do ensaio em branco, para determinar a acidez do meio reacional, foi conduzida a adição da enzima CALB, livre (0,1 g da solução enzimática) ou imobilizada em PU (0,1g, contendo 0,16% de enzima). A reação foi conduzida a 40 °C, durante 40 minutos, em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Para as medidas de acidez, alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v). A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1µmol de ácido graxo por minuto por grama de catalisador, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 2.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times M_{EL} \times V_c} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

V<sub>a</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

V<sub>b</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

$V_f$  = volume final de meio reacional (mL);

$t$  = tempo (min);

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

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

### **3.8 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS**

Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamentos de experimentos, com auxílio do software *Statistica* versão 8.0, com nível de significância de 95% de confiança.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SELEÇÃO DO SUPORTE (D30, D20 E D18) DE POLIURETANO FLEXÍVEL NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

Inicialmente o estudo de imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em PU, foi realizado com três espumas flexíveis de poliuretano de densidades diferentes. Foram estudados o PU de densidade 30 (D30 – espuma dura), PU de densidade 20 (D20 – espuma intermediária) e PU de densidade 18 (D18 – espuma macia).

A Tabela 3 apresenta os resultados da atividade enzimática e do rendimento do processo de imobilização quando utilizando diferentes suportes.

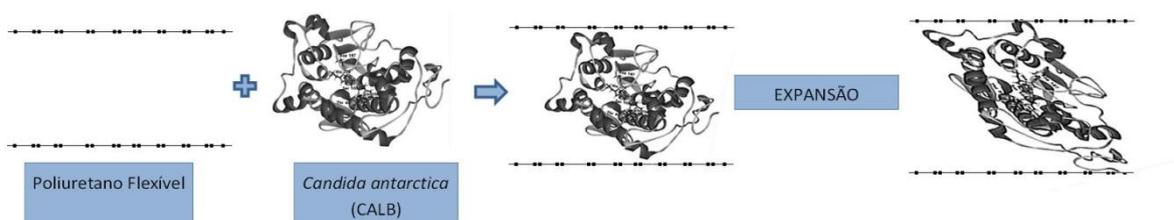
**Tabela 3-** Massa de imobilizado, atividade e rendimento do processo de imobilização da lipase nos diferentes suportes.

|                 | <b>Massa de imobilizado<br/>(g)</b> | <b>Atividade (U/g)</b> | <b>Rendimento<br/>(%)</b> |
|-----------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Suporte         | -----                               | 0                      | -                         |
| Enzima livre    | -----                               | 486,79                 | -                         |
| Imobilizado D30 | 55,8                                | 998,7                  | 2.429,9                   |
| Imobilizado D20 | 50,1                                | 227,2                  | 415,6                     |
| Imobilizado D18 | 45,4                                | 437,7                  | 1.102,1                   |

\*Massa de enzima oferecida na imobilização: 0,6 g,

Os rendimentos de imobilização para os imobilizados em diferentes densidades foram excelentes, variaram entre 415%, para o D20, e 2.429%, para o D30, No entanto não constata-se uma tendência entre o rendimento e a densidade. Os resultados sugerem um efeito benéfico da imobilização sobre a atividade da enzima. Esta tendência pode estar relacionada como a disponibilização (facilidade do acesso) de novos sítios ativos da enzima, devido a ligações químicas entre a enzima e o suporte, o qual durante sua expansão pode proporcionar o esticamento da hélice proteica que é a enzima, expondo os sítios ativos ocultos no interior de sua estrutura, conforme mecanismo proposto e apresentado na Figura 12.

**Figura 12-** Mecanismo sugerido para o processo de imobilização do Lipase de *Candida antarctica* B



Ambos os resultados, comparados com outros materiais e com o próprio PU ramificado, indicando ser o PU linear um excelente suporte para imobilização de lipase “*in situ*”, independente de sua estrutura (linear ou ramificada) e densidade. Nyari (2013) para a enzima CALB suportada em poliuretano rígido, obteve um rendimento de 250%. Nos estudos de imobilização da Cal B em xerogel realizado por Ficanha, (2014) foi observado rendimentos de 183,9 %. Comportamento semelhante foi descrito por Soares et al. (2003) para a lipase microbiana de *Candida rugosa* imobilizada em sílica de porosidade controlada.

Pereira et al. (2003) imobilizaram lipases em quitosana e obtiveram rendimentos inferiores a 17 %. Bayramoglu et al. (2004) obtiveram rendimentos inferiores a 80% para a  $\alpha$ -amilase imobilizada em membrana porosa. Nicoletti, (2014) observou rendimentos de 92% na imobilização de lipase de *Candida antactica* B em PU rígido.

Para a análise da seleção dos suportes de estudos, mais especificamente das diferentes densidades, levou-se em consideração os que apresentassem valores de atividade residual superiores a 40%. Os imobilizados nas diferentes densidades, com relação a medida de atividade, foram monitorados durante 30 dias após a imobilização. A quantificação da atividade residual após transcorrido esse tempo está representada na Tabela 4.

**Tabela 4** - Atividade residual da Lipase imobilizada em PU de diferentes densidades.

| Imobilizados/Densidades | Atividade Inicial | Atividade Residual (%) |
|-------------------------|-------------------|------------------------|
|                         | 0 dias            | Após 30 dias           |
| D30                     | 998,7             | 50                     |
| D20                     | 227,2             | 33                     |
| D18                     | 437,7             | 42                     |

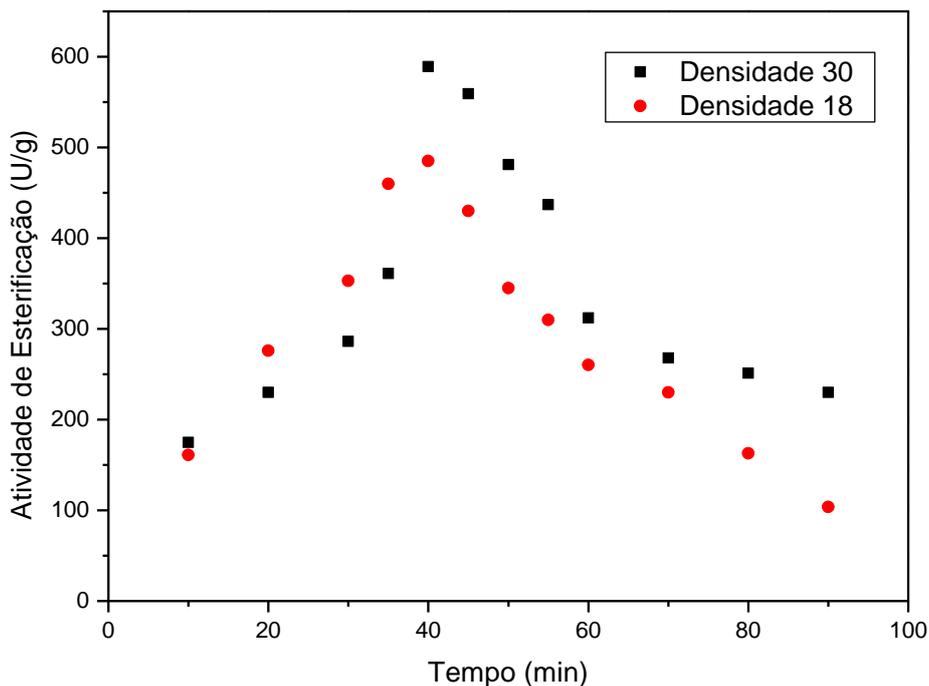
Dentre as diferentes densidades, as que apresentaram atividade residual superior a 40%, após 30 dias, foram as extremas, ou seja, a D30 (PU duro) e a D18 (PU macio).

Associativamente foram estas as que apresentaram os maiores rendimentos de imobilização (Tabela 2). Neste contexto, optou-se por dar continuidade ao trabalho, utilizando somente estes dois suportes.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS TEMPO E TEMPERATURA NA REAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO ENZIMÁTICA POR ESTERIFICAÇÃO

A Figura 13 apresenta os valores da atividade de esterificação para a enzima imobilizada em poliuretano com densidades D30 e D18 em função do tempo de reação, no qual podemos observar que em 40 minutos reacionais ocorre um pico de atividade, o qual foi escolhido como o tempo ótimo para o acompanhamento dos efeitos das demais variáveis estudadas sobre a atividade enzimática.

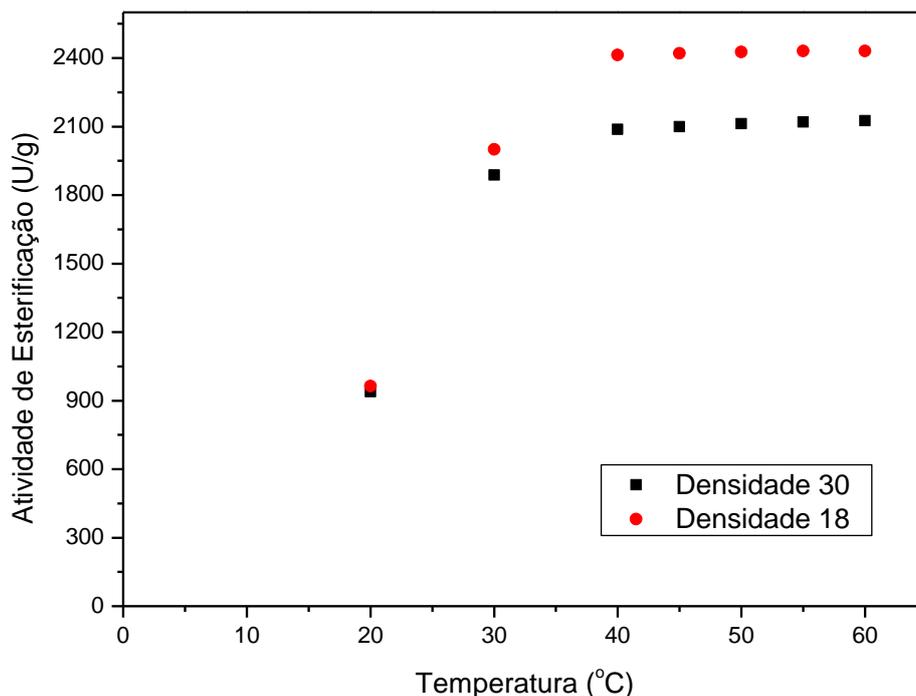
**Figura 13-** Atividade de esterificação para a enzima imobilizada em poliuretano com Densidades D30 e D18 em função do tempo de reação.



Esta tendência sugere a presença de dois mecanismos reacionais (esterificação e hidrólise) vinculadas as lipases. Inicialmente, até os 40 minutos reacionais, temos a predominância da reação de esterificação, a qual gera como produto, além do éster, a água. Com o aumento da concentração de água no sistema reacional, a reação de hidrólise se manifesta, mediante o consumo do éster, levando a uma diminuição da atividade de esterificação.

A Figura 14 apresenta o gráfico da atividade de esterificação da enzima imobilizada em poliuretano com densidades D30 e D18 em função da temperatura de reação, onde pode-se observar que até 40°C há um acréscimo de atividade enzimática-esterificação e após esta temperatura a atividade permanece praticamente constante.

**Figura 14-** Atividade de esterificação da enzima imobilizada em poliuretano com densidades D30 e D18 em função da temperatura de reação.



Os resultados estão coerentes com a literatura que apresenta como faixa de temperatura ótima para a reação de esterificação entre 40 e 50°C (CARVALHO et al., 2013).

Os resultados obtidos para o tempo e temperatura de reação de esterificação para a enzima imobilizada em poliuretanos de densidades D30 e D18 estão coerentes com as condições reacionais utilizadas por Bernardes et al. (2007) e Langone et al. (2002), as quais foram usadas como referências para a medida de atividade enzimática em nosso estudo.

### 4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MEDIDA DE ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO OS IMOBILIZADOS D30 E D18.

#### 4.3.1 Imobilizado D30

A Tabela 5 apresenta os resultados da atividade de esterificação do imobilizado D30 em função da massa do imobilizado e da temperatura testadas no Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup> completo (DCCR).

**Tabela 5-** DCCR 2<sup>2</sup> completo para imobilizado de D30

| Experimento | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | Atividade enzimática – esterificação (U/g) |
|-------------|----------------|----------------|--|
| 1           | -1(0,05)       | -1(25)         | 552,00 (±23,00)                            |
| 2           | 1(0,15)        | -1(25)         | 230,00 (±7,60)                             |
| 3           | -1(0,05)       | 1(55)          | 713,00 (±23,00)                            |
| 4           | 1(0,15)        | 1(55)          | 237,67(±7,67)                              |
| 5           | -1,41(0,0295)  | 0(40)          | 857,63(±38,98)                             |
| 6           | 1,41(0,1705)   | 0(40)          | 238,28(±6,64)                              |
| 7           | 0(0,1)         | -1,41(18,85)   | 414,00(±11,50)                             |
| 8           | 0(0,1)         | 1,41(61,15)    | 184,00(±11,50)                             |
| 9           | 0(0,1)         | 0(40)          | 1.046,50(±11,50)                           |
| 10          | 0(0,1)         | 0(40)          | 1.031,50(±6,64)                            |
| 11          | 0(0,1)         | 0(40)          | 1.035,00(±11,50)                           |

Variáveis independentes: X<sub>1</sub> = Massa do imobilizado (g); X<sub>2</sub> = Temperatura da reação (°C).

Pode-se observar na Tabela 5 que fixando a massa do imobilizado e variando a temperatura de reação (de 25 para 55 °C) ocorre um aumento do valor da atividade de esterificação. Quando se fixa os valores de temperatura da reação e varia-se a massa do imobilizado ocorre também um aumento da atividade esterificação. Para os experimentos 1 e 3 a atividade total do suporte aumentou de 552,00 para 713,00 U/g e nos experimentos 2 e 4 as atividades totais variaram de 230,00 para 237,67 U/g, respectivamente.

Os ensaios do ponto central (ensaios 9, 10 e 11), com aproximadamente 1.035,00 U/g), apresentaram a maior atividade enzimática, indicando uma otimização do sistema reacional.

Os resultados obtidos para a matriz  $2^2$  foram analisados estatisticamente e a Tabela 6 apresenta os coeficientes de regressão de todos os fatores para a resposta (atividade enzimática), a um nível de confiança de 95 %.

**Tabela 6-** Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t(2) do DCCR  $2^2$  completo para a atividade de esterificação da enzima imobilizada em poliuretano de densidade D30 em função da massa do imobilizado e da temperatura de reação.

|  | <b>Coeficiente de regressão</b> | <b>Erro padrão</b> | <b>t(2)</b> | <b>p</b> |
|--|---------------------------------|--------------------|-------------|----------|
| Média                                    | 1037,55                         | 4,61               | 225,21      | 0,000    |
| X <sub>1</sub> Massa do imobilizado (L)  | -201,49                         | 2,83               | -71,31      | 0,000    |
| X <sub>1</sub> Massa do imobilizado (Q)  | -234,43                         | 3,37               | -69,53      | 0,000    |
| X <sub>2</sub> Temperatura da reação (L) | 61,80                           | 2,83               | 21,87       | 0,002    |
| X <sub>2</sub> Temperatura da reação (Q) | -370,97                         | 3,37               | -110,03     | 0,000    |
| X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>           | -38,33                          | 3,99               | -9,61       | 0,011    |

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, todos os fatores avaliados para a ativação foram estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ) no se refere a atividade de esterificação. A partir desses resultados, o modelo empírico de segunda ordem proposto para a atividade de esterificação no delineamento experimental completo  $2^2$  é dado pela Equação 3:

$$AE = 1037,55 - 201,49X_1 - 234,43X_1^2 + 61,80X_2 - 370,96X_2^2 - 38,33X_1X_2 \quad \text{Eq. 3}$$

A Análise de Variância apresentada na Tabela 7 validou o modelo empírico proposto, de acordo com a qual é possível observar que o  $F_{\text{calculado}}$  é maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , com uma porcentagem de variação explicada de 98%.

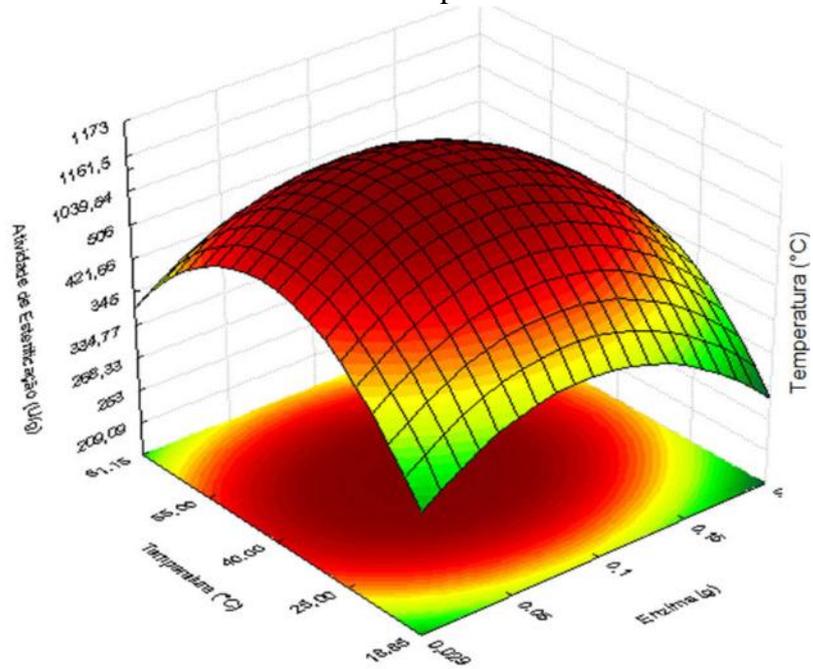
**Tabela 7 -** Análise de variância para o rendimento do imobilizado D30 do DCCR  $2^2$  completo.

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | $F_{\text{calculado}}$ |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|------------------------|
| Regressão         | 1228792,69         | 5                  | 245758,54      | 376,05                 |
| Resíduo           | 3267,60            | 5                  | 653,52         |                        |
| Falta de ajuste   | 3140               | 3                  | 1046,75        |                        |
| Erro puro         | 127                | 2                  | 63,68          |                        |
| Total             | 1232060,29         | 10                 |                |                        |

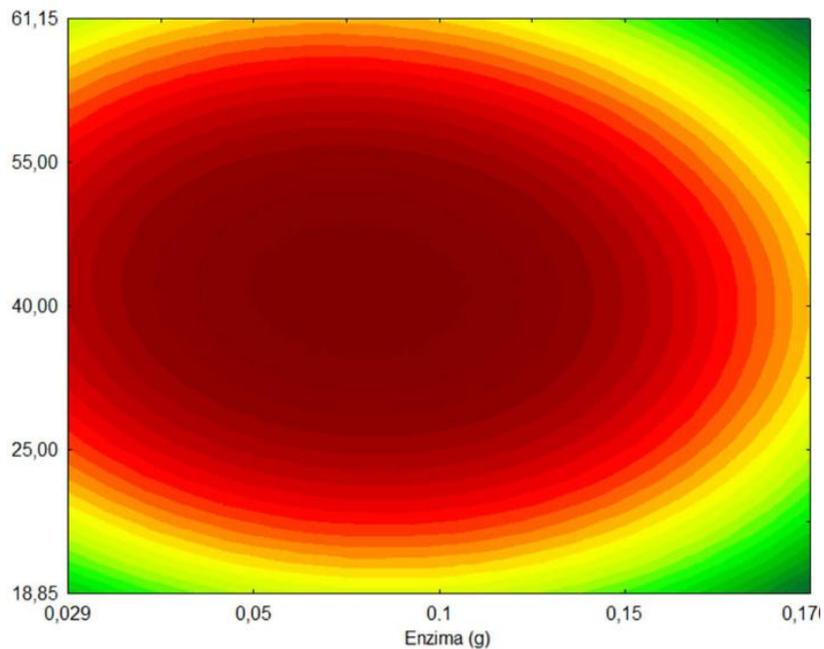
Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; R = 0,99,  $F_{\text{tab}}$ : 5,05

O modelo empírico validado permitiu a construção da superfície de resposta e da curva de contorno (Figura 15).

**Figura 15-** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) das variáveis no rendimento do imobilizado de densidade 30 nos experimentos do DCCR 2<sup>2</sup> completo .



(a)



(b)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 17, as máximas atividades de esterificação para a enzima imobilizada em PU D30 (~1035,00U/g) foram obtidas na

concentração de massa do imobilizado igual a 0,1g e temperatura de reação igual a 40°C.

#### 4.3.2. Imobilizado D18

A Tabela 8 apresenta os resultados da atividade de esterificação da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) imobilização em poliuretano de densidades D18 para as concentrações de enzima e temperatura testadas no Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup> completo (DCCR).

Similarmente ao Imobilizado D30, o Imobilizado D18 quando fixando-se a massa do imobilizado e variando a temperatura de reação (25°C para 55°C) ocorre um aumento do valor da atividade de esterificação (Tabela 8).

**Tabela 8** – DCCR 2<sup>2</sup> completo para imobilizado de PU D18.

| Experimento | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | Atividade enzimática –<br>esterificação<br>(U/g) |
|-------------|----------------|----------------|--|
| 1           | -1(0,05)       | -1(25)         | 345,00(±23,00)                                   |
| 2           | 1(0,15)        | -1(25)         | 268,33(±7,67)                                    |
| 3           | -1(0,05)       | 1(55)          | 506,00(±23,00)                                   |
| 4           | 1(0,15)        | 1(55)          | 334,78(±95,24)                                   |
| 5           | -1,41(0,0295)  | 0(40)          | 1039,55(±22,51)                                  |
| 6           | 1,41(0,1705)   | 0(40)          | 209,09(±6,74)                                    |
| 7           | 0(0,1)         | -1,41(18,85)   | 253,00(±11,50)                                   |
| 8           | 0(0,1)         | 1,41(61,15)    | 421,67(±6,64)                                    |
| 9           | 0(0,1)         | 0(40)          | 1173,00(±11,50)                                  |
| 10          | 0(0,1)         | 0(40)          | 1157,67(±6,64)                                   |
| 11          | 0(0,1)         | 0(40)          | 1161,50(±11,50)                                  |

Variáveis independentes: X<sub>1</sub> = Massa do imobilizado (g); X<sub>2</sub> = Temperatura da reação (°C).

Quando se fixa os valores de temperatura da reação e varia-se a massa do imobilizado ocorre também um aumento da atividade esterificação. Para os experimentos 1 e 3 a atividade total do suporte aumentou de 345,00 para 506,00 U/g e nos experimentos 2 e 4 as atividades totais variaram de 268,33 para 334,78 U/g, respectivamente.

Também o Imobilizado D18 apresentou a maior atividade enzimática (1061,00 U/g) para os ensaios do ponto central (Tabela 7), caracterizando assim um processo otimizado.

A Tabela 9 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t(2), para a atividade de esterificação a um nível de confiança de 95 %.

**Tabela 9-** Coeficiente de regressão e erro padrão, valores de p e t(2) do DCCR 2<sup>2</sup> completo para a atividade de esterificação da enzima imobilizada em poliuretano de densidade D18 em função da massa do imobilizado e da temperatura de reação.

|  | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t       | P     |
|--|--------------------------|-------------|---------|-------|
| Média                                    | 1164,50                  | 4,61        | 252,77  | 0,000 |
| X <sub>1</sub> Massa do imobilizado (L)  | -177,88                  | 2,83        | -62,96  | 0,000 |
| X <sub>1</sub> Massa do imobilizado (Q)  | -300,18                  | 3,37        | -89,03  | 0,000 |
| X <sub>2</sub> Temperatura da reação (L) | 58,33                    | 2,83        | 20,64   | 0,002 |
| X <sub>2</sub> Temperatura da reação (Q) | -444,53                  | 3,37        | -131,85 | 0,000 |
| X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>           | -23,64                   | 3,99        | -5,92   | 0,027 |

A Equação 4 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade enzimática-esterificação do Imobilizado D18 em função das variáveis massa do imobilizado e temperatura de reação.

$$AE=1164,50 - 177,88X_1 - 300,18X_1^2 + 58,33X_2 - 444,53X_2^2 - 23,63X_1.X_2 \quad \text{Eq. 4}$$

O modelo foi validado pela análise de variância na qual se obteve um coeficiente de correlação de 0,95, com um F<sub>calculado</sub> 2,32 vezes maior do que o F<sub>tabelado</sub> (Tabela 10).

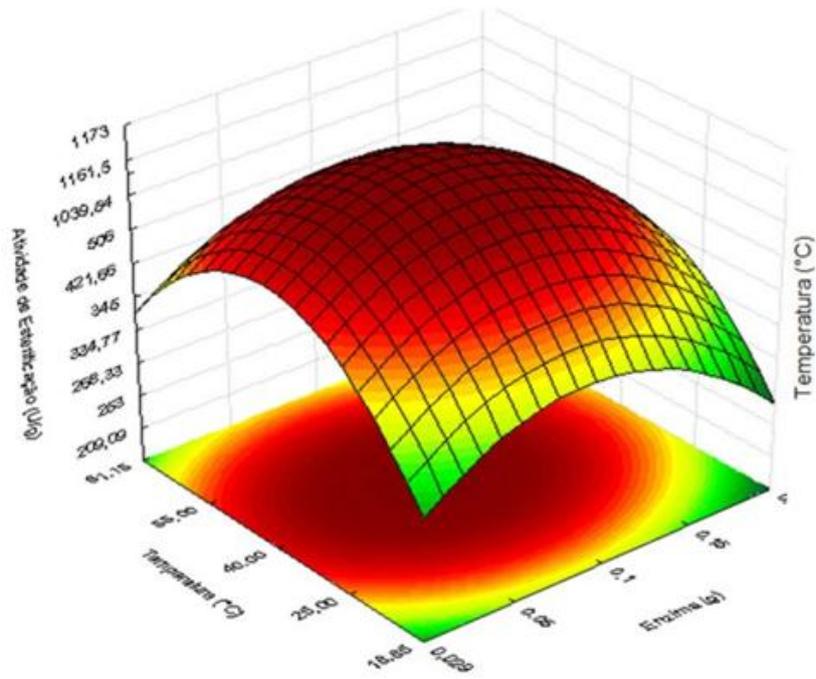
**Tabela 10-** Análise de variância para o rendimento do imobilizado D18 do DCCR 2<sup>2</sup> completo.

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor Fcalc |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|-------------|
| Regressão         | 1566998,72         | 5                  | 313399,74      | 11,74       |
| Resíduo           | 133428,57          | 5                  | 26685,71       |             |
| Falta de ajuste   | 133301             | 3                  | 44433,74       |             |
| Erro puro         | 127                | 2                  | 63,68          |             |
| Total             | 1700427,29         | 10                 |                |             |

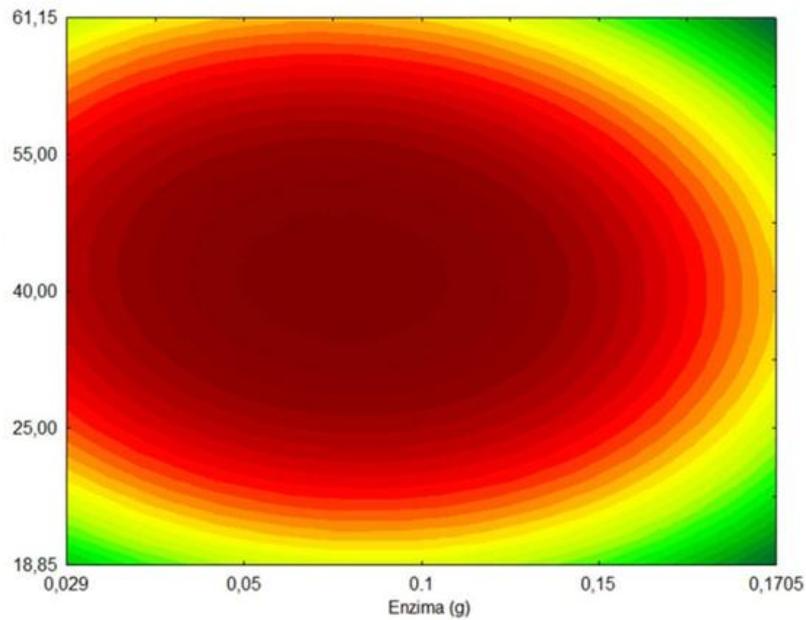
Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; Ftab: 5,05

O modelo empírico validado permitiu a construção da superfície de resposta e da curva de contorno Figura 16.

**Figura 10-** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) das variáveis no rendimento do imobilizado de densidade 18 no DCCR 2<sup>2</sup> completo.



(a)



(b)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 16, as máximas atividades de esterificação da enzima imobilizada em PU D18 (~1161,50 U/g) foram obtidas com 0,1g de massa do imobilizado e temperatura de 40 °C.

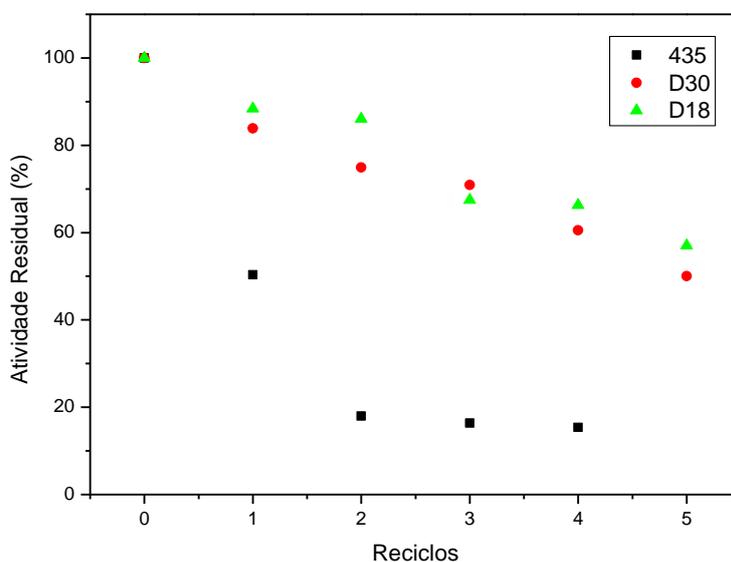
As condições reacionais ótimas (0,1g de imobilizado, 40 °C e 40 min.) para as espumas de PU D30 e D18 não diferem das condições já otimizadas por Paroul, (2011), que estudou o processo de esterificação da CALB livre. Sendo assim, podemos concluir que a eficiência do processo de esterificação não é influenciada por este tipo de suporte.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO RECICLO OPERACIONAL DO IMOBILIZADO

A reutilização de enzimas em mais de um ciclo de reação é um dos principais objetivos da imobilização, este fato é importante para as enzimas, visto que, o custo da enzima, em muitos processos, é um dos principais problemas quando se refere a sua aplicação industrial. Normalmente, considera-se que uma enzima pode ser reutilizada até a sua atividade ser maior ou igual a 50 % do valor da atividade inicial (FICANHA, 2014).

A possibilidade de reutilizar a lipase de *Candida antarctica* B imobilizada foi determinada por reações de síntese de oleato de etila empregando dois diferentes métodos de reusos: Reuso contínuo (sem lavagem) e a cada 24 horas com lavagem em diferentes solventes orgânicos. Os resultados são apresentados nas Figuras 17, 18, e 19, respectivamente.

**Figura 11-** Número de reciclos dos Imobilizados D30, D18 e da lipase comercial Novozyme 435 com reuso contínuo.

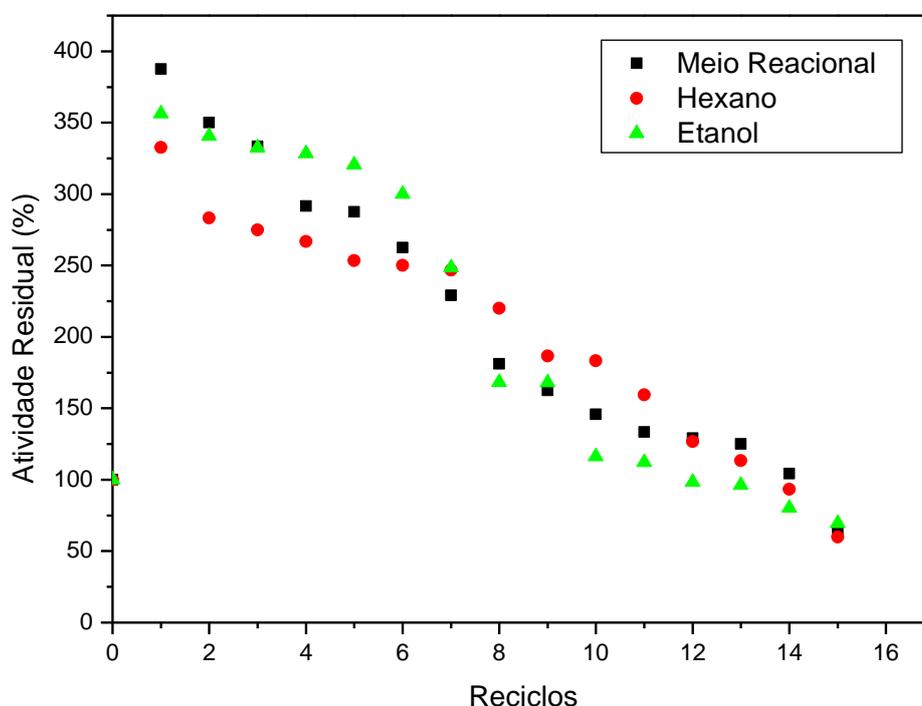


Como pode-se observar na Figura 17, os Imobilizados D30 e D18, apresentaram um número de ciclos com atividade residual de  $\approx 50\%$  igual a 5, indicando que eles poderiam ser reutilizados em torno de 5 vezes em um mesmo processo reacional para síntese do oleato de etila. Além disso, os mesmos apresentam um número de ciclos superior ao observado para a lipase comercial Novozyme 435, a qual apresentou a partir do 2 ciclo uma atividade residual de  $\approx 20\%$ .

Nyari (2013), estudando o processo de imobilização de CAL B em PU rígido obteve 30 ciclos para o sistema de reuso contínuo, resultado este, superior aos obtidos no presente estudo com PU flexível. Este maior número de ciclos observado por Nyari (2013) foi vinculado a forma reticulada (células fechadas) de polimerização, proporcionando um melhor confinamento da enzima em relação ao PU linear, que apresenta células abertas, permitindo a lixiviação da enzima.

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos para o número de ciclos do Imobilizado D30 reutilizado a cada 24 horas após lavagem com diferentes solventes orgânicos (hexano, metanol, etanol e meio reacional).

**Figura 18-** Número de ciclos do imobilizado D30 com lavagem em diferentes solventes.



A pré-lavagem, antes de cada ciclo, com diferentes solventes conduziu a um comportamento diferente do observado para o sistema contínuo. Para este sistema, independente do solvente utilizado observa-se um aumento da atividade residual inicial

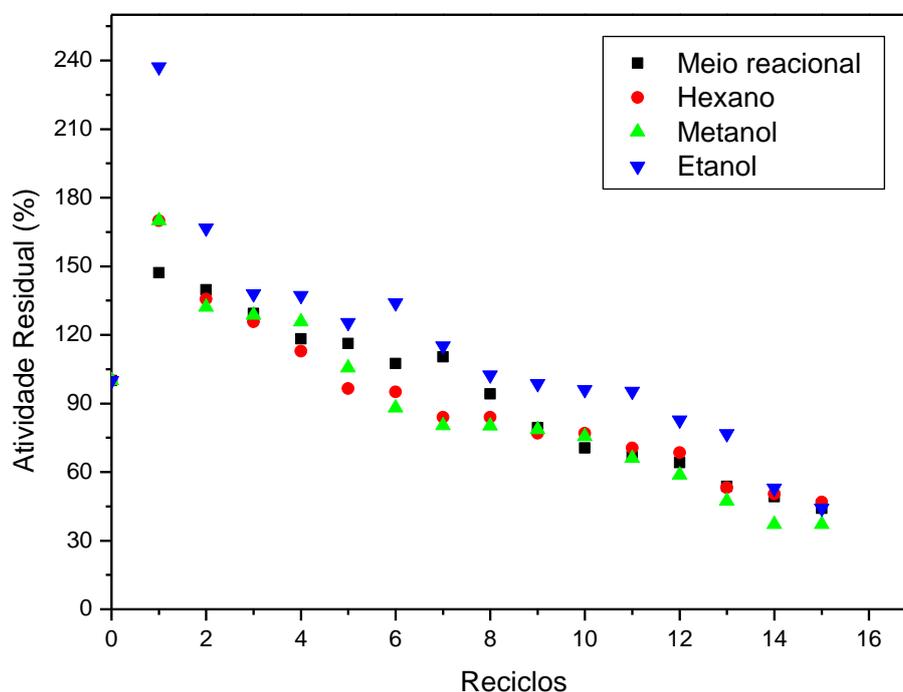
a valores de  $\approx 400\%$  no segundo ciclo, seguido de uma perda de atividade, atingindo novamente os 100% de atividade residual com 15 reciclós.

A mesma tendência observada para todos os solventes, dos quais um é o próprio meio reacional, sugere não ser a lavagem, mas sim o período entre ciclos e a secagem do suporte os fator determinantes para o aumento da atividade residual após o primeiro ciclo.

Para o imobilizado 30 não foi possível avaliar o estudo do reciclo com o metanol, pois em ensaios preliminares, o processo de secagem do imobilizado não foi eficiente. O imobilizado após transcorrido 24 horas ainda apresentava-se úmido, e por não se ter conhecimento de como o solvente poderia interferir no processo subsequente de atividade de esterificação, optou –se por não fazer o estudo com o referido solvente.

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos para o numero de reciclós do Imobilizada D18 reutilizado a cada 24 horas após lavagem com diferentes solventes orgânicos (hexano, metanol, etanol, e meio reacional).

**Figura 19-** Número de reciclós do imobilizado D18 com lavagem em diferentes solventes.



Similarmente ao observado para o imobilizado D30, verifica-se um aumento da atividade residual (porém bem menos intensa) no primeiro ciclo, seguido de perda de atividade nos ciclos subsequentes voltando a ter uma atividade residual de 100% no quinto ciclo e de 50 % no décimo terceiro ciclo.

Nyari (2013), estudando o processo de imobilização de CALB em PU rígido obteve 35 ciclos em sistema de reuso com lavagens em etanol. Resultado este, superior aos obtidos no presente estudo com PU flexível D30 (15 ciclos) e D18 (15 ciclos).

O fato de enzimas manterem a atividade catalítica em solventes orgânicos não possui explicação simples. A hipótese mais aceita é de que, quando a enzima é colocada em solvente orgânico anidro, esta é cineticamente “congelada” no seu estado nativo. Isso ocorre em parte devido à baixa constante dielétrica do meio, que produz uma maior efetividade nas forças eletrostáticas responsáveis pela manutenção da estrutura enzimática (ZAKS e KLIBANOV, 1985; SECUNDO et al., 1992).

A dependência entre estes fatores ocorreu principalmente pela dificuldade no deslocamento das moléculas de água presente na cavidade hidrofóbica do sítio de ligação da enzima durante a ligação enzima-substrato. O deslocamento destas moléculas de água é termodinamicamente menos favorecido em solventes hidrofóbicos do que naqueles hidrofílicos. Os solventes hidrofóbicos não retiram a água de solvatação da estrutura protéica, prevenindo a desnaturação e mantendo a estrutura conformacional da enzima. Moléculas do solvente podem ainda interagir com a estrutura proteica e exercer efeitos ativadores ou estabilizadores, efeitos esses que também podem estar relacionados com a presença do suporte quando se trabalha com enzimas imobilizadas (PENCREACH; BARATTI, 1997).

Nesta interação com a estrutura proteica, ainda deve ser considerado que solventes apolares podem manter a enzima em sua conformação aberta, ou seja, na presença destes solventes, a tampa hidrofóbica não estaria cobrindo o sítio ativo, o que poderia manter ou até aumentar a atividade enzimática (RÚA et al., 1993).

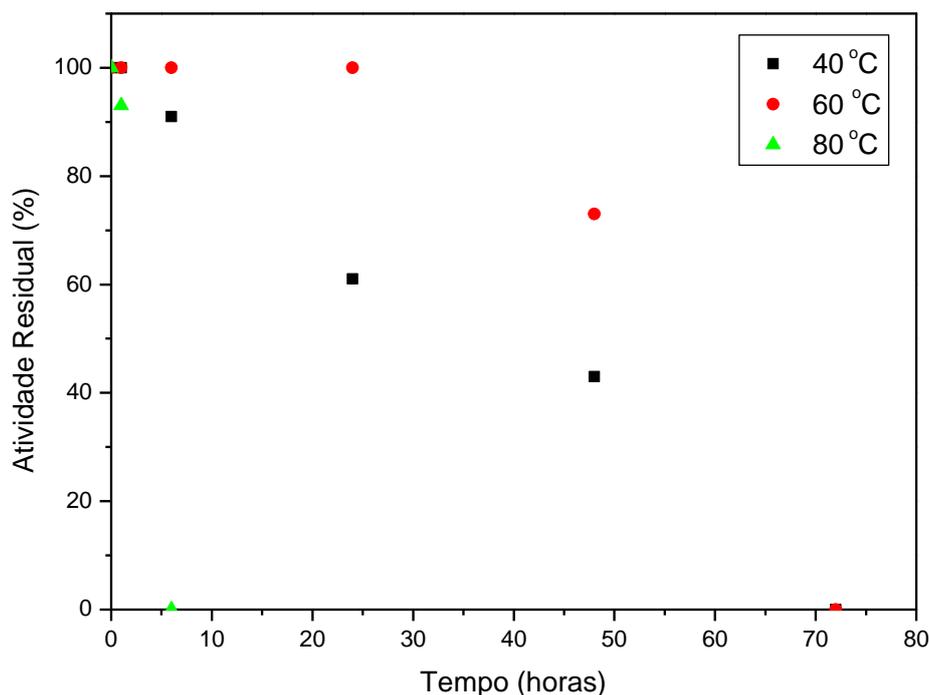
## **4.5 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO**

### **4.5.1 Avaliação da estabilidade térmica da CALB livre**

O estudo da estabilidade de estocagem é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial é mantida ao longo do tempo de armazenamento nas diferentes temperaturas.

Inicialmente fez-se o estudo da estabilidade de estocagem da lipase na sua forma livre (Figura 20).

**Figura 20-** Estabilidade de estocagem frente e altas temperaturas para a Lipase de *Candida antarctica* B livre



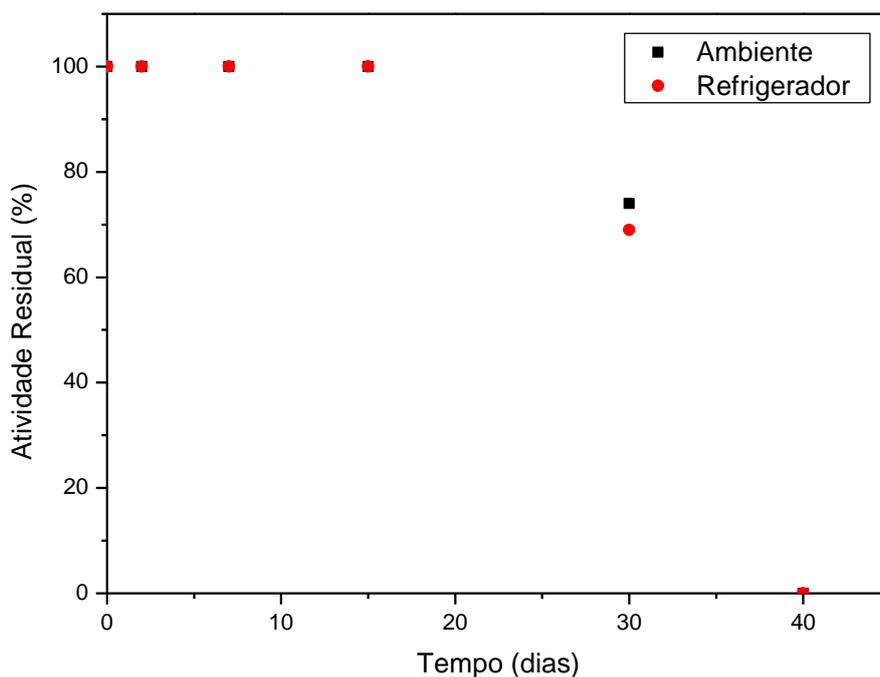
Observa-se uma diminuição da atividade com o tempo de contato para todas as temperaturas avaliadas, bem como uma relação direta com a temperatura. As maiores temperaturas apresentaram desativações mais rápidas. Para a temperatura de 80°C a inativação foi total com 6 horas de contato. Para as temperaturas de 60 e 40°C a inativação total somente foi observada com 72 h de contato.

As temperaturas de refrigeração (entre 2 e 5 °C ) e ambiente (entre 10 e 30°C) permitiram um maior tempo de armazenamento sem perda da atividade (Figura 21).

Lipases de *Candida rugosa* livre e imobilizada em quitosana por ligação covalente, foram incubadas a 50 °C por Simões et al. (2011). A lipase na forma livre apresentou 20 % da atividade residual após 60 minutos de incubação, enquanto a lipase na forma imobilizada manteve 60 % da atividade inicial nesse mesmo período de tempo. Esses dados indicam que o procedimento de imobilização atuou no sentido de aumentar a estabilidade térmica da enzima. Para que uma enzima tenha potencial para aplicação industrial um requisito importante é a estabilidade térmica, já que muitos processos utilizam temperatura na faixa de 40 a 50°C (CARVALHO et al., 2013).

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

**Figura 21-** Estabilidade de estocagem frente a temperatura ambiente e de refrigerador da Lipase de *Candida antarctica* B livre.



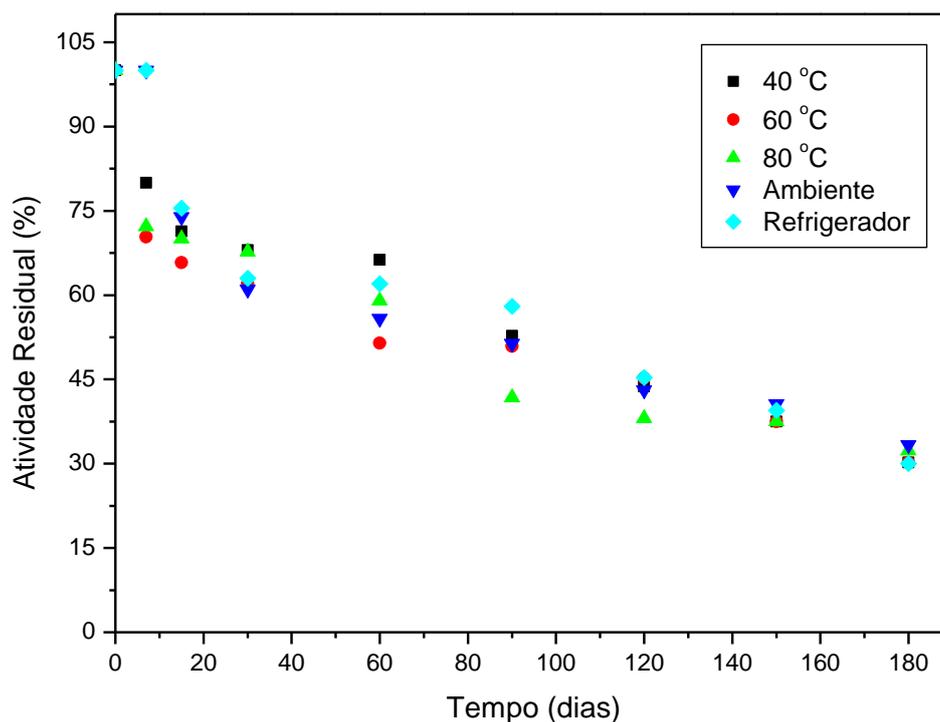
As enzimas na sua forma solúvel são moléculas proteicas complexas e de certa flexibilidade, sua atividade catalítica provem uma estrutura altamente ordenada, muito delicada e frágil. Se a molécula absorve muita energia, pode ocorrer mudanças conformacionais nos seus sítios ativos, muitas vezes irreversíveis,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

#### 4.5.2 Avaliação da estabilidade térmica do Imobilizados D30 e D18

Os resultados da estabilidade de estocagem frente a diferentes temperaturas para os Imobilizados D30 e D18 estão apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Cabe mencionar que é muito interessante para aplicação industrial que os biocatalisadores resistam a uma ampla faixa de temperatura, uma vez que poderão ser utilizados em diversas condições reacionais. Em termos de aplicação, também é atraente que o derivado imobilizado resista por um longo período de tempo nas temperaturas determinadas.

**Figura 122-** Estabilidade Térmica do imobilizado de densidade 30.

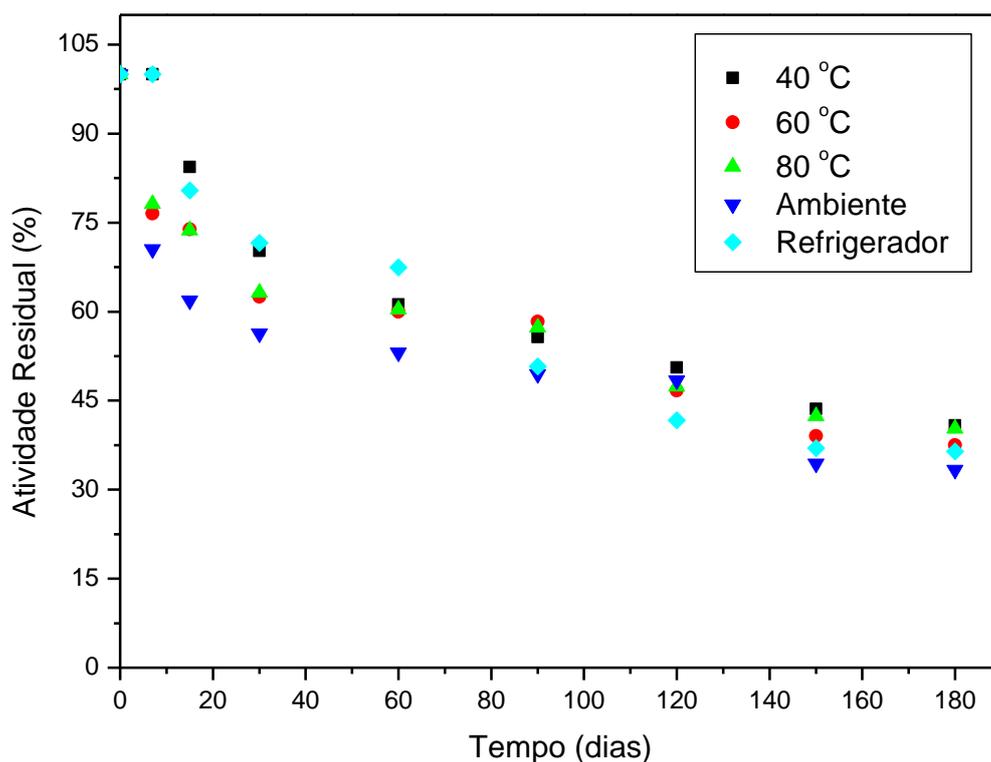


De acordo com a Figura 22, o imobilizado D30 apresentou o mesmo comportamento ao longo do tempo, ou seja, uma diminuição da atividade residual, para todas as temperaturas de estocagem estudadas, atingindo os 50% de atividade residual em 90 dias.

Nyari (2013), observou que independente da temperatura de armazenamento, a lipase de *Candida antarctica* B imobilizada em PU rígido manteve sua atividade residual acima de 95 % pelo período avaliado (45 dias). No estudo de Ficanha (2014), onde imobilizou-se lipase de *Candida antarctica* B em xerogel os derivados nucleofílicos com PEG foram os que apresentaram os maiores tempos de meia vida com 203 dias em baixas temperaturas (entre 2 e 5 °C).

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

**Figura 133-** Estabilidade Térmica imobilizado de denticidade 18.



O imobilizado D18 (Figura 23) apresentou o mesmo comportamento observado para o Imobilizado D30, ou seja, uma perda de atividade residual com o tempo, apresentando uma atividade residual de 50% em aproximadamente 90 dias. Mostrando que a estabilidade da enzima imobilizada é superior daquela apresentada pela Cal B livre.

Os resultados observados para os Imobilizados D30 e D18 são promissores considerando os relatados pela literatura para outros suportes. Blanco et al., (2004) verificou para a enzima CAL B imobilizado em Accurel (polipropileno) e poliestireno um aumento de três vezes no tempo de estabilidade em relação a enzima livre, com um tempo de meia vida de apenas 5 dias.

Para a invertase imobilizada em PU, Cadena et al., (2010) observaram uma estabilidade por um período de 60 dias, sem perda considerável atividade (68,5 % de retenção da atividade).

Yilmaz et al. (2010; 2011), observaram que as lipases de *Candida rugosa* imobilizadas em matriz sol-gel mantinham uma atividade residual de  $\approx 90\%$  por 50 dias quando armazenadas a 4°C enquanto a enzima livre, após 12 dias apresentou 15 % da atividade residual.

## 5. CONCLUSÕES

Esse estudo apresenta um novo suporte para imobilização de enzimas, o qual ao nosso conhecimento ainda não foi mencionado na literatura para esse fim. Os mecanismos de imobilização propostos para justificar o aumento da atividade de esterificação e do rendimento, podem auxiliar na compreensão de resultados obtidos para outros trabalhos nesta área de pesquisa.

O perfil de atividade em relação ao tempo de reação, vinculou-se a duas tendências, relacionadas a concentração de água;

O DCCR 2<sup>2</sup> completo possibilitou maximização das condições operacionais da medida de atividade (esterificação) para os imobilizados D30 e D18;

O suporte também se mostrou promissor, devido ao seu número de ciclos tanto quando se faz a utilização de solvente ou não. Também quando se fala em estabilidade térmica o suporte comportou-se de forma satisfatória, pois a enzima imobilizadas mantiveram suas atividades, tanto em temperaturas baixas quanto elevadas, por um período de tempo considerável.

A partir dos resultados obtidos com o processo de imobilização em relação a atividade de esterificação e rendimento do imobilizado, propo-se um mecanismo de reação;

A estabilidade térmica da enzima imobilizada é superior daquela apresentada pela Lipase de *Candida antactica* B livre.

•

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- ✓ Avaliar o potencial de aplicação da enzima imobilizada D30 e D18 em reações de síntese de aromas e no tratamento de efluentes;
- ✓ Avaliar o efeito da ativação enzimática em alta pressão (CO<sub>2</sub> e GLP), sobre a atividade catalítica da enzima imobilizada;
- ✓ Avaliar o efeito da ativação enzimática em aparelho ultrassônico;
- ✓ Avaliar a eficiência da enzima imobilizada D30 e D18 em sistema reacional de fluxo contínuo;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. L.; AKCELRUD, L. C. Síntese e Caracterização de Poliuretanos Segmentados Contendo Blocos de Massa molar Controlado. Parte 1 Preparação e Caracterização dos Materiais. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 9, p. 23-27, 1999.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterisation of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnology Letter*, v. 21, p. 313, 1999.
- 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.
- BATISTELLA, L.; USTRA, M. K.; RICHETTI, A.; PERGHER, S. B.C.; TREICHEL, H.; J. V. OLIVEIRA, J. V. ; LERIN, L. ; DE OLIVEIRA, D.. Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, p. 351–358, 2012.
- BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chemistry*, v. 84, n. 4, p. 591-599, 2004.
- BERNARDES; O. L.; BEVILAQUA, J. V.; LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D.M.G.; LAGNONE, M. A. P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 32, p. 136-140, 2007.
- BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; PÉREZ, M. F.; OTERO, C.; GONZÁLEZ, G., Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 83-93, 2004.
- BRÍGIDA, A. I. S. **Estudo da imobilização de lípase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra de casca de coco verde como suporte**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2006.
- BRÍGIDA, A.; PINHEIRO, Á.; FERREIRA, A.; GONÇALVES, L. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. *Applied Biotechnology*, v. 146, p. 173-187, 2008.
- CADENA, P. G.; JERONIMO, R. A. S.; MELO, J. M.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresource technology*, v.101, p. 1595-1602, 2010.
- CANTONE, S., SPIZZO, P., FATTOR, D., FERRARIO, V., EBERT, C., GARDOSI, L. Lipases for bio-based chemistry-Efficient immobilised biocatalysts for competitive biocatalysed processes. *Chimica oggi-chemistry today*, v.30, p.10-14, 2012.

- CAO, X.; YANG, J.; SHU, L.; YU, B.; YAN, Y. Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bio imprinting with substrate analogues. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 177-182, 2009.
- CARVALHO, N. B.; BARBOSA, J. M. P.; OLIVEIRA, M. V. S.; FRICKS, A. T.; LIMA A. S.; SOARES, C. M. F. Biochemical properties of *Bacillus* sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol-gel process. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 52-58, 2013.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analítica**, v. 23, p. 60-70, 2006.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CRUZ JÚNIOR, A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2007.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DE ORY, I.; ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 547-555, 2004.
- DENG, X.; FANG, Z.; LIU, Y.; YU, C. Production of biodiesel from *Jatropha* oil catalyzed by nanosized solid basic catalyst. **Energy**, v. 36, n. 2, p. 777-784, 2011.
- DIAS, M. A.; LACERDA, I. C. A.; PIMENTEL, P. F.; DE CASTRO, H. F.; ROSA, C. A. Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 1-5, 2001.
- DUMITRIU, E.; SECUNDO, F.; PATARIN, J.; FECHETE, I. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 119-133, 2003.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, Springer-Verlag: Berlin, 1997.
- FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.; COCCA, J.; MATEO, C.; MORO, P.; TERRENI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. Regio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis. **Tetrahedron**, v. 59, n. 30, p. 5705-5711, 2003.
- FERRAZ, L.R.; OLIVEIRA, D.S.; SILVA, M.F.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. **Produção de lipase microbiana por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais**, 3º Simpósio de Segurança Alimentar. Anais 3º Simpósio de Segurança Alimentar, Florianópolis, 2010.
- FERREIRA, E. M. M. **Uso de espuma de poliuretano na extração de índio de meio iodeto**. Tese (Doutorado em Química) Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.
- FICANHA, M. M. A. **Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B (CalB) pela técnica de sol - gel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade

Regional Ingrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, 2014.

- FREITAS, L. Seleção de Rota **Enzimática para Produção de Monoglicérides empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**. (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena 2006.
- GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. *Chirality Program*, v.17, p.1-15, 2005.
- GANDHI, Neena N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.
- GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Dissertação (Mestrado Ciência de Alimentos ) Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3, p. 111-120, 2006.
- HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.
- HASEGAWA, S.; AZUMA, M.; TAKAHASHI, K. Enzymatic esterification of lactic acid, utilizing the basicity of particular polar organic solvents to suppress the acidity of lactic acid. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 83, p.1503-510, 2008.
- HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads. **Enzyme and microbial technology**, v. 49, p. 72-78, 2011.
- HERRINGTON, R.; HOCK, K. **Dow polyurethanes flexible foams**, 2 ed. Midland MI: Dow Chemical Publications, 1997.
- IDRIS, A., BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 550-563, 2012.
- INOUE, D.Y.; SILVA, G. S. da; DORS, G.; FURIGO-JUNIOR, A.; CASTRO, H. F. C de. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 2, p. 197-203, 2011.
- JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JANG, W. Y.; KRAYNIK, A. M.; KYRIAKIDES, S. On the microstructure of open-cell foams and its effect on elastic properties. **Internacional Journal of Solids and Structure**, v. 45, p.1845-1875, 2008.
- JÚNIOR, A. **Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2008.

- KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica* : Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research e Development**, v. 6, p. 446-451, 2002.
- LAN, Q.; HAUGSTAD, G. Characterization of polymer morphology in polyurethane foams using atomic force microscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 2644-2651, 2011.
- LANGONE, M. A.; DE ABREU, M. E.; REZENDE, M. J.; SANT'ANNA, JR. G. L. Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 100, p. 987-996, 2002.
- LASSALLE, V. L.; FERREIRA, M. L. Lipase-catalyzed synthesis of polylactic acid: an overview of experimental aspects. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**; v. 83, p. 1493–1502, 2008.
- LOZANO, P.; PÉREZ-MARIN, A.; DIEGO, T. D.; GÓMEZ, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M.; RIOS, G.; IBORRA, J. 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, n. 1, p. 55-64, 2002.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros, Determinação de peso molecular e análise térmica**. E-papers, Rio de Janeiro, 2001.
- MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Reviews*, v. 3, Intercept Ltd., 1985.
- MARTINI, V. Q. **Resolução do (±)-Citronelol e Ácido (±)-Citronílico Via Esterificação Enantiosseletiva Catalisada pela Lipase de *Candida antarctica***. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Regional de Blumenau. Blumenau - SC, 2007.
- MAUGARD, T.; LEGOY, M. Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin A in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 8, n. 4, p. 275-280, 2000.
- MCCABE, R.; RODGER, A.; TAYLOR, A. A study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 70–74, 2005.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F.; *Int. Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, p. 503. 24, 2013.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. de; OLIVEIRA, P. C. de. Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial, **Química Nova**, Vol. 34, No. 5, 831-840, 2011a.
- MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F.; **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, p.109. 23, 2011b.
- NICOLETTI, G. **Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranyl propionato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

- NYARI, D. L. N. **Estudo da imobilização de Lipase *Candida antarctica* B em poliuretano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Ingrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2013.
- OH, Y.S.; MAENG, J.; KIM, J. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Microbiology Biotechnology*, v. 54, p. 418–423, 2000.
- PALASKAR, D. V.; BOYER, A.; CLOUTET, E.; ALFOS, C.; CRAMAIL H. Synthesis of Biobased Polyurethane from Oleic and Ricinoleic Acids as the Renewable Resources via the AB-Type Self-Condensation Approach. *Biomacromolecules*, v. 11, p. 1202–1211, 2010.
- PALOMO, J. M.; MUNOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19, p. 279–286, 2002.
- PALOMO, J. M.; SEGURA, R.; MATEO, C.; TERRENI, M.; GUIBAN, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. *Tetrahedron*, v. 16, n. 4, p. 869–874, 2005.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, p. 119, 1999.
- PAROUL, N. **Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico**. Tese (Doutorado em XX) Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.
- PECHAR, T. W.; WILKES, G. L.; ZHOU, B.; LUO, N. Characterization of Soy-Based Polyurethane Networks Prepared with Different Diisocyanates and Their Blends with Petroleum-Based Polyols. *Journal of Applied Polymer Science*, v.106, p. 2350–2362, 2007.
- PENCREACH, G.; BARATTI, J. C. Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.47, p. 630–635, 1997.
- PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, n. 4, p. 343–355, 2003.
- PIROZZI, D.; GRECO, G. Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, n. 2, p. 94–100, 2004.
- RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; DE OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. *Environmental Engineering Science*, v. 25, n. 9, p. 1243–1248, 2008b.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2009.
- RODRIGUES, D.; MENDES, A.; ADRIANO, W.; GONÇALVES, L.; GIORDANO, R. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose

- activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p.100–109, 2008.
- RODRIGUES, J. M. E. **Preparação de poliuretana à base de óleo de mamona**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- RÚA, M. L.; DIAZMAURINO, T.; FERNANDEZ, V. M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of 2 distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1156, p. 181-189, 1993.
- SANTOS, L. A. S. dos. **Conceitos Gerais e Procedimentos Operacionais da Fabricação de Espumas Flexíveis de Poliuretano**. Manual do fabricante de espumas – TOMO I. 2009
- SARDA, L.; DESNUELE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 58, p. 513-521, 1958.
- SCHWAB, L. W.; KROON, R.; SCHOUTEN, A. J.; LLOOS, K. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of unsubstituted  $\beta$ -lactam. **Macromolecular Rapid Communication**, v.29, p.794–797, 2008.
- SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; SECUNDO, F.; RIVA, S.; CARREA, G. Effect of medium and reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales. **Tetrahedron Asymmetry**, v.3, p. 267-280, 1992.
- SERVE, V. **Espumas Flexíveis de poliuretana à base de óleo de mamona etoxilado**. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química-Universidade de Campinas -UNICAMP, Campinas-SP, 2007
- SHARMA, R.; CHISTY, Y.; BANERJEE, U. C. Production purification, characterization and application of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p.627-662, 2001.
- SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Imobilização de fungos produtores de lipase intracelular em esponjas de poliuretano. **Anais do simpósio nacional de bioprocessos - SHEB**, Natal – RN, 2009.
- SILVA, G. S.; BRUNO, L. M.; DE CASTRO, H. F. Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular. **Anais do simpósio nacional de bioprocessos–SINAFERM**, Natal – RN, 2009.
- SILVA, J.; MACEDO, G.; RODRIGUES, D.; GIORDANO, R.; GONÇALVES, L. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Journal Biochemical Engineering**, v. 60, p. 16-24, 2012.
- SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. MENDES, A. A. Desempenho da matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, p. 33-38, 2011.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 832-838, 2003.
- SOARES, S. M. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. Dissertação

- (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia – USP, Lorena – SP, 2012.
- SONG, C., LIU, G. L., XU, J. L., CHi, Z. M. Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 954-960, 2010
- STRAATHOF, A.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.
- TORRES, R., ORTIZ, C., PESSELA, B. C., PALOMO, J. M., MATEO, C., GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, p. 167-171, 2011.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, 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.
- VILAR, W. D. **Química e Tecnologia de Poliuretano**. Terceira Edição, Vilar Consultoria Técnica Ltda, 2004.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HASS, M. J. C. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.
- WINLKER, F. K.; GUBERNATOR, K. **Lipases - their structure, biochemistry and application**. Cambridge University Press: Cambridge, 1994.
- YILGOR, I.; YILGOR, E.; GULER, I. G.; WARD, T.C.; WILKES, G. L. FTIR investigation of influence of diisocyanate symmetry on the morphology development in model segmented polyurethanes. **Polymer**, v. 47, p. 4105-4114, 2006.
- YILMAZ, E., SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol-gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 35-41, 2011.
- YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 162-168, 2010.
- ZAIAT, M. **Desenvolvimento de Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) para Tratamento de Águas Residuárias**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 82, p. 3192-3196, 1985.
- ZECK, S. E. C. **Utilização de espumas uretânicas no tratamento de óleo mineral isolante contaminado com PCB**. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba – PR, 2004.