

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO CAMPUS DE
ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

TIAGO DOS SANTOS GONÇALVES

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO “*IN SITU*” DE ESPUMA DE POLIURETANO
SINTETIZADO NA PRESENÇA DE GLUTARALDEÍDO**

ERECHIM – RS

2018

TIAGO DOS SANTOS GONÇALVES

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO “*IN SITU*” DE ESPUMA DE POLIURETANO
SINTETIZADO NA PRESENÇA DE GLUTARALDEÍDO**

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

**Orientadores: Dr. Rogério M. Dallago
Dr. Alexander Junges**

ERECHIM – RS

2018

TIAGO DOS SANTOS GONÇALVES

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO “*IN SITU*” DE ESPUMA DE POLIURETANO
SINTETIZADO NA PRESENÇA DE GLUTARALDEÍDO**

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

**Orientadores: Dr. Rogério M. Dallago
Dr. Alexander Junges**

Erechim, 13 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Marcos Dallago (Orientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Prof. Dr. Alexander Junges (Orientador)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni (Banca examinadora)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Profa. Dra. Clarissa Dalla Rosa (Banca examinadora)

Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS Erechim
FICHA CATALOGRÁFICA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar o meu caminho. A minha esposa Alessandra Klidzio, por trilhar todo o caminho junto comigo desde 2004 com todos seus conselhos, incentivos, paciência e confiança, em que ofereço o mérito de mais uma conquista, e todas as palavras sobre ela são pequenas perante o bem que meu porto seguro me proporciona. Aos meus filhos Gustavo, Heloísa e Ana Beatriz por iluminarem minha vida nos momentos mais turbulentos, cada um com suas contribuições para desviar o foco das preocupações cotidianas e me ensinar quais são minhas prioridades nesta existência.

À minha mãe, pelo amor incondicional e por toda a valorização que deu a minha formação e educação. Ao meu pai Carlos Alberto Gonçalves (*in memoriam*) por todo o apoio e educação recebidos durante a minha vida, pelo exemplo de perseverança e resiliência. Aos meus irmãos, que sempre estiveram juntos em todas as dificuldades que enfrentamos.

Aos meus orientadores, Rogério Marcos Dallago e Alexander Junges, pela amizade, conhecimento, confiança e dedicação.

Aos colegas do laboratório de tratamento de efluentes e ambiental da URI que me apoiaram nesta importante etapa de minha vida.

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

Muito obrigado!

“Ninguém pode te impedir de fazer o que você quiser, se
você estiver determinado e colocar isso em sua mente.
Você sempre pode encontrar uma desculpa para não fazer
algo, mas será apenas uma desculpa. Você não pode
culpar ninguém a não ser você mesmo. Ninguém além de
você é responsável pelo seu fracasso.”

Ben Carson

RESUMO

Enzimas atuam em várias áreas tecnológicas, com vantagens competitivas em relação aos processos químicos, mas são frágeis e sofrem processos de desnaturação. Processos de imobilização têm objetivo de minimizar estes problemas, com diferentes metodologias inclusive a ligação covalente. A espuma de poliuretano foi escolhida como suporte para imobilização por ligação covalente que a literatura apresenta 3 etapas: produção do suporte, funcionalização do suporte, reação entre aminoácidos da enzima e grupo funcional introduzido no suporte, e, para este trabalho o agente de ligação entre suporte e a enzima (lipase) será o glutaraldeído. O objetivo deste trabalho é a produção do suporte funcionalizado *in situ* no momento da polimerização do suporte que seja capaz de realizar a imobilização por ligação covalente, metodologia esta sem observação na literatura. Pela originalidade do trabalho é necessário a realização da otimização das proporções dos reagentes (poliol, isocianato, glicerina e glutaraldeído) e condições de reação (temperatura, sequencia de adição de reagentes e utilização de ácido), tendo como referência a uniformidade dos poros da espuma, resistência mecânica e glutaraldeído incorporado ao suporte, com a realização dos testes de COT, Felhing, Schiff e atividade do suporte para otimizar formulação da espuma. A formulação ótima do suporte é : (7 mL de poliol, 4 mL de isocianato, 1 mL de glutaraldeído 50% (m/v), 1 mL de glicerina, 0,2 mL de H_3PO_4 3 mol.L⁻¹). O planejamento experimental da imobilização por ligação covalente da lipase com tem variáveis pH e temperatura. A cinética de imobilização e atividade do suporte resultam na otimização deste processo com pH 10,0, temperatura de 20 °C, tempo de contato de 160 minutos. Houve uma comparação de métodos de imobilização entre ligação covalente e adsorção devido ao caráter hidrofóbico do suporte, com atividade do suporte superior para a ligação covalente. Pelo escurecimento do suporte em função do volume de glutaraldeído ao longo do tempo, é possível que o mecanismo de incorporação do glutaraldeído na espuma seja similar à reação de Maillard com o glutaraldeído agindo como o açúcar redutor e o suporte de poliuretano simulando como uma proteína.

Palavras-chave: Imobilização Enzimática. Ligação covalente. Adsorção. Lipase. Glicerina. Reação de Maillard.

ABSTRACT

Enzymes act in several technological areas, with competitive advantages over chemical processes, but are fragile and undergo denaturation processes. Immobilization processes aim to minimize this problem, with different methodologies including covalent bonding. The polyurethane foam was chosen as support for immobilization by covalent binding. The literature presents 3 steps: production of the support, functionalization of the support, reaction between amino acids of the enzyme and functional group introduced in the support, and for this work the binding agent between and the enzyme (lipase) will be glutaraldehyde. The objective of this work is the production of the functionalized support *in situ* at the moment of the polymerization of the support that is able to perform the immobilization by covalent bond, methodology without observation in the literature. Due to the originality of the work, it is necessary to optimize the proportions of the reactants (polyol, isocyanate, glycerol and glutaraldehyde) and reaction conditions (temperature, reagent addition sequence and acid utilization), with reference to the uniformity of foam pores, mechanical resistance and glutaraldehyde incorporated into the support, with the accomplishment of the TOC, Fehling, Schiff tests and support activity to optimize foam formulation. The optimum formulation of the support is with the volumetric ratio of reactants: (7 mL of polyol, 4 mL of isocyanate, 1 mL of 50% glutaraldehyde (m/v), 1 mL of glycerin, 0,2 mL of 3 mol H_3PO_4 mol L^{-1}). The experimental design of immobilization by covalent attachment of lipase with pH and temperature variables. The kinetics of immobilization and support activity results in the optimization of this process with pH 10.0, temperature of 20 ° C, contact time of 160 minutes. There was a comparison of immobilization methods between covalent binding and adsorption due to the hydrophobic character of the support, with superior support activity for covalent attachment. By darkening the carrier as a function of the volume of glutaraldehyde over time, it is possible that the mechanism of incorporation of glutaraldehyde in the foam is similar to the Maillard reaction with glutaraldehyde acting as the reducing sugar and the polyurethane carrier simulating as a protein.

Keywords: Enzyme immobilization. Covalent bonding. Adsorption. Lipase. Glycerol. Maillard reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Níveis estruturais em uma proteína.	8
Figura 2: Conformação estrutural de proteína.....	8
Figura 3: Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação catalisadas por lipase.	10
Figura 4: Métodos para imobilização de enzimas.	14
Figura 5: Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos.	17
Figura 6: Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta.	19
Figura 7: Esquema representativo de imobilização de enzimas em suportes com aldeídos. ...	23
Figura 8: Reação enzima-suporte - Formação da Base de Schiff.	26
Figura 9: Reações com isocianato gerando em: (a) Uretana, (b) Uréia.	31
Figura 10: Estruturas de ressonância do grupamento isocianato.	31
Figura 11: Isômeros de tolueno diisocianato (TDI).	32
Figura 12: Reação de formação da ligação uretana.....	34
Figura 13: Reação de formação do grupo uréia.	35
Figura 14: Reação de formação do ácido carbâmico.	35
Figura 15: Reação de decomposição do ácido carbâmico.....	36
Figura 16: Reação entre isocianato e uretano produzindo alofanato.	36
Figura 17: Reação entre isocianato e uréia produzindo biureto.	37
Figura 18: Sequencia da produção de EPU via processo “One Shot”.	38
Figura 19: Reagentes para a produção da EPU em: (a) Polioliol, (b) Isocianato, (c) Glutaraldeído e (d) Glicerina.....	41
Figura 20: Curva padrão de COT versus glutaraldeído em solução (m/v).....	50

- Figura 21:** Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioli:isocianato de 7:3 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.56
- Figura 22:** Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioli:isocianato de 6:4 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.57
- Figura 23:** Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioli:isocianato de 5:5 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.57
- Figura 24:** Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioli:isocianato de 4:6 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.58
- Figura 25:** Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioli:isocianato de 3:7 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.58
- Figura 26:** Teste de Schiff para espumas respectivamente, **(a)** sem glutaraldeído, **(b)** com glutaraldeído.59
- Figura 27:** EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioli:isocianato de 7:3 (Grupo a – Tabela 7) acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.....61
- Figura 28:** EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioli:isocianato de 7:3 (Grupo b – Tabela 7) acrescido de glicerina e glutaraldeído 50% (m/v) em volumes iguais **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.61
- Figura 29:** EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioli:isocianato de 7:3 (Grupo c – Tabela 7) acrescido de glicerina e glutaraldeído 50% (m/v) em volumes iguais, acidificado, **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL. Temp. (23 - 25°C).62
- Figura 30:** EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioli:isocianato de 7:3 (Grupo d – Tabela 7) acrescido de glicerina e glutaraldeído em volumes iguais, acidificado, **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL. Temp. de 40°C.62
- Figura 31:** Padrão visual empírico para identificação semi-quantitativa de glutaraldeído lixiviado mediante Teste de Felhing: **(a)** pouco precipitado, **(b)** médio precipitado e **(c)** muito precipitado.64
- Figura 32:** Padrão visual para o Teste de Felhing – cor da água de lavagem de suporte, respectivamente **(a)** azul e **(b)** verde.65
- Figura 33:** Cor das espumas sintetizadas com diferentes volumes de glutaraldeído a 50% (m/v) no dia 0 (**(a)** controle (0,0 mL), **(b)** 0,5 mL, **(c)** 1,0 mL, **(d)** 1,5 mL e **(e)** 2,0 mL) e no

dia 81 ((f) controle (0,0 mL), (g) 0,5 mL, (h) 1,0 mL, (i) 1,5 mL e (j) 2,0 mL).	69
Figura 34: Variação de cor total (ΔE) durante armazenamento das espumas.	70
Figura 35: Variação de luminosidade (L^*) total durante armazenamento das espumas.	70
Figura 36: Variação do parâmetro (a^*) durante armazenamento das espumas.	71
Figura 37: Variação do parâmetro (b^*) total durante armazenamento das espumas.	71
Figura 38: Comparação de estrutura grupo uretano e amina secundária.	73
Figura 39: Formação da enamina.	73
Figura 40: Protonação da carbonila em meio ácido.	74
Figura 41: Ataque nucleofílico da amina secundária seguido de perda de água.	74
Figura 42: Atividade relativa da solução enzimática em função do tempo de contato com o suporte para o processo de imobilização conduzido com pH 6 a 20°C.	79
Figura 43: Superfície de Resposta (a) e Curva de Contorno (b) para a imobilização por ligação covalente da lipase em espuma de poliuretano funcionalizada com glutaraldeído.	82
Figura 44: Mecanismo catalítico da lipase.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.	9
Tabela 2: Propriedades Tecnológicas do Sistema de Imobilização Enzimático.	13
Tabela 3: Suportes para imobilização de enzimas.	15
Tabela 4: Grupamento funcional da enzima com potencial de ligação covalente ao suporte funcionalizado.	22
Tabela 5: Sequencia dos trabalhos experimentais.	43
Tabela 6: Razão volumétrica dos reagentes (poliol: isocianato: glutaraldeído).	44
Tabela 7: Formulação de suportes (EPU) para imobilização de enzimas.....	46
Tabela 8: Valor de branco para COT das espumas utilizando a Equação 1.....	51
Tabela 9: Variáveis independentes e níveis empregados no planejamento fatorial 2 ²	53
Tabela 10: Identificação de glutaraldeído lixiviado empregando o Teste de Fehling.	66
Tabela 11: Valores de glutaraldeído lixiviado empregando com resposta os valores de COT, bem como o rendimento de incorporação.....	67
Tabela 12: Otimização da formulação da espuma para imobilização enzimática.	76
Tabela 13: Valores reais e codificados para a resposta de atividade enzimática dos imobilizados após 160 minutos reacionais.	79
Tabela 14: Valores estimados para o processo de imobilização por ligação covalente da lipase com os dados experimentais da Tabela 13.....	80
Tabela 15: Coeficiente de regressão para o processo de imobilização por ligação covalente da lipase com os dados experimentais da Tabela 13.	80
Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) para o processo de imobilização por ligação covalente da lipase com os dados experimentais da Tabela 13.	80
Tabela 17: Propriedades de Aminoácidos.....	87
Tabela 18: Estrutura molecular de aminoácidos que realizam ligação de Schiff (desprotonados), em ordem decrescente de preferência.....	88

Tabela 19: Comparação entre métodos de imobilização.	89
Tabela 20: Trabalhos de imobilização enzimática de lipase.....	91

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Aplicações das Enzimas.	110
Anexo 2: Métodos de imobilização de enzimas.....	111

LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E UNIDADES

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

CO₂ – Dióxido de Carbono

COT – Carbono Orgânico Total

EC – Enzyme Commission

EPU – Espuma de Poliuretano

g – Gramas

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

H₃PO₄ – Ácido Fosfórico

HCl – Ácido Clorídrico

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

kDa – Kilo Dalton

M – Molar

mg – Miligramas

mL – Mililitros

NaOH – Hidróxido de Sódio

PA - Poliamida

PC - Policarbonato

pH - Potencial Hidrogeniônico

PHA – Polihidroxialcanoato

PHB – Polihidroxibutirato

PU - Poliuretano

SnCl₂ – Cloreto de Estanho

SnCl₄ – Tetracloreto de Estanho

TDI – Diisocianato de Tolueno

Ti₂(SO₄)₃ – Sulfato de Titânio

TiCl₃ – Cloreto de Titânio III

TiCl₄ – Tetracloreto de Titânio

VCl₃ – Cloreto de Vanádio

ZnCl₄ – Tetracloreto de Zinco

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	3
2OBJETIVOS	6
2.1OBJETIVO GERAL	6
2.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1ENZIMAS.....	7
3.1.1Lipase.....	9
3.1.1.1Reações catalisadas por lipase	10
3.1.1.2Lipase proveniente de <i>Aspergillus oryzae</i>	11
3.2IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	12
3.2.1Métodos de imobilização.....	14
3.2.1.1Imobilização por Adsorção Física	15
3.2.1.2Imobilização por Ligação Iônica	17
3.2.1.3Imobilização por Ligação Metálica	18
3.2.1.4Imobilização por Ligação Cruzada.....	18
3.2.1.5Imobilização por Entrelaçamento	20
3.2.1.6Imobilização em Membranas	21
3.2.1.7Imobilização por Ligação Covalente.....	21
3.3SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	26
3.4POLIURETANOS (PU)	28
3.4.1Histórico do Poliuretano	29
3.4.2Isocianatos.....	30
3.4.3Polióis.....	32
3.4.4Reações na produção de PU	33
3.4.4.1Reação com álcool.....	34
3.4.4.2Reação com amina.....	35
3.4.4.3Reação com a água	35
3.4.4.4Reação com uretano e ureia.....	36
3.4.5Processo “One Shot” de produção de espumas de poliuretano	37
4MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1MATERIAIS.....	40
4.1.1Reagentes.....	40
4.1.1.1Enzima	40
4.1.1.2Suporte.....	41

4.1.2Equipamentos	41
4.2MÉTODOS.....	42
4.2.1Síntese da Espuma de poliuretano funcionalizada.....	44
4.2.1.1Avaliação da razão volumétrica entre poli-ol, isocianato e glutaraldeído.	44
4.2.1.2Avaliação da adição de glicerina e acidificação meio reacional sobre a qualidade da espuma.....	45
4.2.1.3Ensaio de lixiviação	48
4.2.1.4Teste de Schiff	48
4.2.1.5Teste de Fehling.....	48
4.2.1.6Determinação do Teor de Carbono Orgânico Total (COT)	49
4.2.1.7Avaliação da cor da espuma por Colorímetro: influência do glutaraldeído	52
4.2.2Imobilização da Lipase	53
4.2.2.1Determinação da atividade enzimática da Lipase.....	54
4.2.3Análise Estatística	55
5RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1SÍNTESE DO POLIURETANO (PU): avaliação das proporções volumétricas poli- ol:isocianato:glutaraldeído	56
5.2SÍNTESE DO POLIURETANO (PU): efeito da adição de glicerina, ácido fosfórico e temperatura.	61
5.3ENSAIOS DE LIXIVIAÇÃO	64
5.4ENSAIOS NO COLORÍMETRO: efeito do glutaraldeído no suporte.....	69
5.5AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	75
5.6OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS E CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO	78
5.7IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE <i>versus</i> ADSORÇÃO	89
6CONCLUSÕES E SUGESTÕES	93
6.1CONCLUSÕES.....	93
6.2SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	94
7REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8ANEXO.....	110

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO “*IN SITU*” DE ESPUMA DE POLIURETANO SINTETIZADO NA PRESENÇA DE GLUTARALDEÍDO

Por quê?

- ✓ Enzimas são biocompatíveis, biodegradáveis e um recurso renovável;
- ✓ Processos enzimáticos apresentam baixos impactos ambientais;
- ✓ Enzimas desnaturam com relativa facilidade e apresentam dificuldade em separação do meio reacional por serem hidrossolúveis o que pode tornar processos economicamente inviáveis;
- ✓ Imobilização de enzimas pode reduzir estes problemas com o aumento da estabilidade;
- ✓ Possibilidade de reutilização das enzimas;
- ✓ Espuma de poliuretano é um polímero versátil, com grande resistência mecânica, pouco biodegradável, relativamente barato, simplicidade de manufatura, sendo o suporte escolhido para este trabalho;
- ✓ Imobilização por ligação covalente pode melhorar os parâmetros de estabilidade devido a enzima estar quimicamente ligada ao suporte, com uma ligação de energia maior do que processos físicos de ligação.

Quem faz?

- ✓ Há trabalhos de utilização da EPU como suporte para imobilização por adsorção e encapsulamento em matriz polimérica;
- ✓ Não constam na literatura a utilização de EPU como suporte pelo processo de ligação covalente;
- ✓ Imobilização por ligação covalente trabalha em 3 etapas: (1) Produção do suporte, (2) funcionalização do suporte, (3) reação entre suporte e enzima;
- ✓ Não constam na literatura a funcionalização *in-situ* de EPU, com o glutaraldeído como agente de ligação entre o suporte e a enzima, para

processos de ligação covalente, reduzindo o número de etapas produtivas de 3 para 2, sendo os processos de produção do suporte (polimerização do PU) e sua funcionalização (glutaraldeído) ocorrendo concomitantemente.

Hipóteses

- ✓ É possível produzir a EPU com o glutaraldeído na reação de polimerização?
- ✓ O glutaraldeído liga-se à estrutura do suporte por processos físicos ou apresentam-se quimicamente ligada à espuma?
- ✓ Se o glutaraldeído estiver quimicamente ligado à espuma, quais partes preferenciais desta ligação e suas condições de reação?
- ✓ A enzima se mantém ativa durante e após o processo de imobilização?

Métodos experimentais

- ✓ Investigar a lixiviação de glutaraldeído da espuma;
- ✓ Estudar o processo de interação enzima suporte na imobilização por ligação covalente;
- ✓ Analisar quais os mecanismos de ligação entre glutaraldeído e estrutura da espuma.

Respostas

- ✓ Observar lixiviação do glutaraldeído da estrutura da espuma;
- ✓ Definir as melhores condições de produção da espuma com o glutaraldeído envolvido na reação com base na lixiviação de glutaraldeído e estrutura da espuma;
- ✓ Aperfeiçoar as condições de ligação covalente entre o suporte e a lipase que proporcionam maior atividade enzimática após imobilização.

1 INTRODUÇÃO

A partir de 1990, o desenvolvimento tecnológico tem atingido dimensões incalculáveis, e dentre desse contexto, os processos biotecnológicos industriais merecem destaque especial (SHARMA; LEBLANC, 2017; NADAR *et al.*, 2018; SÓTI *et al.*, 2018; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2018; KOBAKHIDZE *et al.*, 2018). (FABER, 2011) A biocatálise e a tecnologia enzimática são processos que apresentam significativa relevância social, ambiental e econômica, uma vez que constituem ferramentas promissoras para a síntese de compostos de alto valor agregado, principalmente devido a sua elevada especificidade em relação aos catalisadores inorgânicos. Associativamente apresentam menor consumo de energia, devido as condições brandas de reação, e em muitos processos, maior atividade catalítica, em conjunto com estabilidade conformacional frente a solventes orgânicos. Ao substituírem processos químicos, os processos biocatalíticos tendem a gerar um menor impacto ambiental, a reduzir gastos em setores industriais, e, melhorar a qualidade dos produtos (de CASTRO *et al.*, 2004; MODI *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2018).

No entanto, apesar dos benefícios, a substituição de catalisadores químicos pelo uso de enzimas não é generalizada nos processos industriais, devido principalmente à instabilidade das enzimas frente às condições do processo (pH, temperatura, pressão), com consequente queda da atividade durante as reações. Por serem hidrossolúveis, as enzimas apresentam uma dificuldade no processo de separação do meio reacional chegando a impossibilitar a sua recuperação e reutilização, aumentando os custos de processo pelo seu ainda alto custo de aquisição (COELHO; SALGADO; DIAS, 2008; CHOI *et al.*, 2015; URRUTIA *et al.*, 2018a; HU *et al.*, 2018).

Frente a isso, com a finalidade de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências desse processo, as técnicas de imobilização de enzimas surgem como alternativa para solucionar alguns destes inconvenientes, pois com a imobilização, o catalisador homogêneo, facilmente perdido após a reação, torna-se um catalisador heterogêneo, facilmente separável do meio reacional, permitindo sua reutilização, podendo apresentar maior estabilidade em comparação com a enzima solúvel (BOLIVAR *et al.*, 2010). Essa possibilidade, além de permitir maior facilidade e conveniência em reatores de batelada, permite usar a enzima imobilizada em reatores de fluxo contínuo, como em recheio de coluna (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004), permitindo que o processo biotecnológico seja economicamente viável, reduzindo assim um dos grandes desafios do processo biotecnológico que é o custo de da enzima.

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são

baseadas em mecanismos físicos e químicos, com a imobilização podendo ocorrer por (i) adsorção (de ALMEIDA *et al.*, 2018), (ii) ligação da enzima em um material insolúvel (GIRELLI *et al.*, 2012), (iii) emprego de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas (CHEN *et al.*, 2017), (iv) confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos (DALLAGO *et al.*, 2015a; NYARI *et al.*, 2016) ou (v) encapsulação através de uma membrana polimérica (MONG THU; KRASAEKOOPT, 2016; DALLAGO *et al.*, 2015b, DALLA-VECHIA *et al.*, 2004).

Novas metodologias/processos de imobilização, bem como novas aplicações industriais têm sido frequentemente relatados na literatura (ZANIN e MORAES, 2004), com destaque para as que consegue imobilizar a enzima *in situ*, durante a etapa de síntese do suporte.

Dentro deste contexto, este grupo de pesquisa desenvolveu uma metodologia de imobilização inédita e muito promissora, a qual emprega como suporte o poliuretano, sendo a enzima agregada *in situ*, a um dos monômeros, previamente a reação de polimerização (SILVA *et al.*, 2013; DALLAGO *et al.*, 2014; NYARI *et al.*, 2016), com o poliuretano como suporte deste método de imobilização enzimática (NYARI, 2013).

No entanto, durante os estudos com o suporte de poliuretano constatou-se que para algumas enzimas, o processo de imobilização com a enzima agregada *in situ* conduzia a inativação da enzima, devido a etapa de polimerização ser exotérmica, além de comprometer as etapas de reciclo, sugerindo que a enzima se encontrava imobilizada por confinamento ou via interações fracas, permitindo sua lixiviação do suporte durante as etapas de reciclo (NYARI *et al.*, 2016).

Uma alternativa para contornar ambos os problemas seria a imobilização mediante ligação covalente da enzima com o suporte, a qual por apresentar elevada estabilidade química minimiza perdas da enzima por lixiviação, permitindo um maior número de reciclos. Além disso, sendo a etapa de imobilização conduzida em temperaturas controladas, normalmente ambiente, evitará possíveis inativações térmicas, como as observadas no processo de imobilização *in situ* no poliuretano (MATEO *et al.*, 2007).

Na imobilização por ligação covalente, normalmente a interação da enzima com o suporte se dá mediante ligação covalente entre grupos aldeído (-CHO) do suporte com os grupos aminas (-NH₂) terminais das enzimas (BABAKI *et al.*, 2015).

Em relação a este tema, observa-se na literatura uma carência de suportes funcionalizados com grupos aldeídos, a tal ponto que na maioria dos artigos envolvendo imobilização enzimática via ligação covalente, o processo é conduzido em múltiplas etapas, começando pela síntese do suporte, funcionalização com grupos aminos, adição de

glutaraldeído como ponte de ligação e finalmente a imobilização da enzima (GUISÁN, 1988).

Neste contexto, se justifica a realização da presente proposta, cujo objetivo é produzir suportes de poliuretano funcionalizados com grupos aldeídos, mediante a adição de glutaraldeído durante a etapa de polimerização, buscando em uma única etapa a síntese do suporte e sua funcionalização, os quais serão empregados posteriormente para a imobilização enzimática, ampliando assim as possibilidades de aplicação deste tipo de suporte (PU), o qual caracteriza-se por apresentar elevada estabilidade química e térmica, além de ser facilmente sintetizado.

Espuma de poliuretano (EPU) pode ser utilizada no processo de imobilização de enzimas por adsorção (REMPEL *et al.*, 2018), ligação metálica (HOODA, 2018), encapsulamento em matrizes (SILVA *et al.*, 2013) e até mesmo por ligação covalente que neste caso a espuma foi posteriormente ativada para realizar a imobilização, conforme trabalhos na literatura (NICOLETTI, 2014).

O caráter inovador deste trabalho está na produção e funcionalização *in situ* de poliuretano sintetizado na presença de glutaraldeído, para que este suporte possa realizar imobilização por ligação covalente, reduzindo e simplificando as metodologias de produção de suportes para esta finalidade. Ainda, durante o processo de formação do suporte, podem-se introduzir os reagentes nos formatos que forem necessitados pela tecnologia, tais como tubulações para a produção de reatores PFR, recheios de colunas a fim de produzir colunas reativas e até mesmo pratos de destilação fracionada com potencial de promover reações químicas.

A produção do poliuretano com funcionalização do suporte *in situ* apresenta várias possibilidades de inovação, na produção do suporte barato, nas aplicações reacionais, e, com potencial de reduzir ainda mais os custos de processo enzimático com a concentração e imobilização das enzimas no seu meio reacional líquido (com as devidas condições de imobilização), reduzindo as etapas de purificação e concentração das enzimas que tanto aumentam o seu custo final, portanto sendo um meio auxiliar de aumento de quantidade de aplicações enzimáticas com a redução de custos de processos nas reações e preparo de suportes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo principal a síntese de um suporte de poliuretano (PU) funcionalizado *in situ* com grupos aldeídos mediante incorporação de glutaraldeído durante a etapa de polimerização.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- i)** Investigar o efeito da adição, *in situ*, do glutaraldeído na síntese de espuma de poliuretano (EPU) funcionalizado com grupos aldeídos reativos;
- ii)** Comparar o efeito da adição de glicerina na estrutura da espuma;
- iii)** Avaliar o efeito da acidificação do meio reacional em relação a estrutura da espuma;
- iv)** Otimizar das condições operacionais da imobilização de lipase em EPU funcionalizado com glutaraldeído (pH, temperatura, tempo);
- v)** Realizar um estudo comparativo entre método de imobilização por adsorção e ligação covalente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre enzimas (como a lipase como enzima modelo), síntese do suporte (poliuretano e suas reações características) e métodos de imobilização com ênfase na imobilização por ligação covalente, que caracteriza o tema central deste trabalho que é a funcionalização do suporte com grupos aldeídos reativo.

3.1 ENZIMAS

O primeiro registro do uso de enzimas foi em 1783 com Lazzaro Spallanzani observando a degradação da carne pelo suco gástrico. Em 1814, Kirchhoff percebeu que a substância encontrada no extrato cevada era capaz de transformar o amido em dextrina e glicose, introduzindo o termo *diástasis*, do grego separação, denominou-se posteriormente de *amilase*, tornando-se a nomenclatura atual para enzimas, cujo nome inicia-se com o substrato sobre o qual atua a enzima com o aproveitamento do sufixo -ase (diástase) (REGULY, 1996).

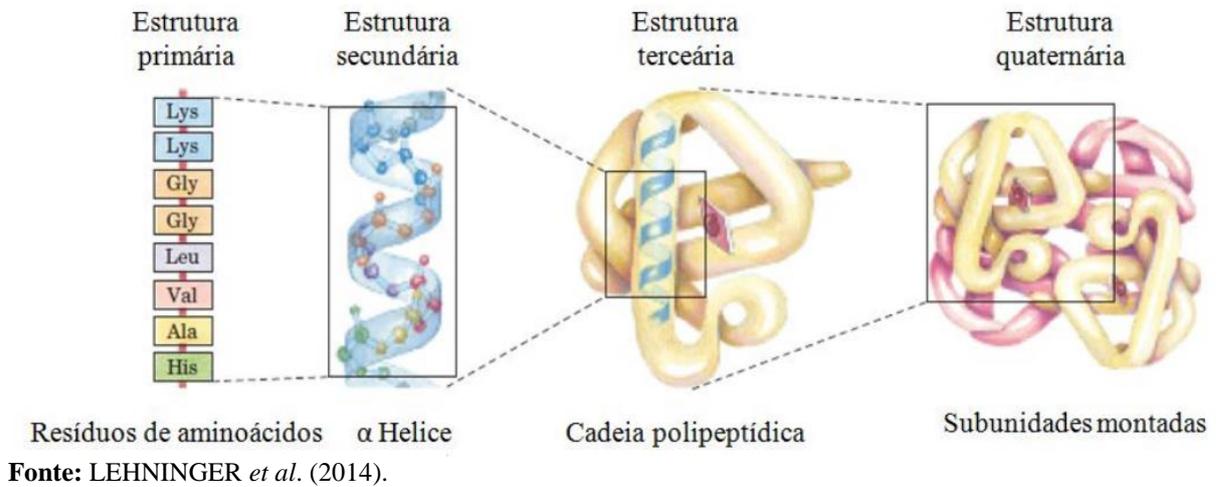
Em 1878, o termo enzima foi introduzido por Wilhelm Kühne para descrever o fermento solúvel, denominada de “força vital” por Pasteur, originada da palavra grega *ενζύμο* (énsimo, formado de *én* = em e *simo* = fermento ou levedura). Eduard Büchner descobriu que as enzimas mantinham atividade fora do meio celular, sendo laureado com o Nobel de Química em 1.907, conhecimento primordial da indústria enzimática atual (COELHO; SALGADO; DIAS, 2008; REZENDE *et al.*, 2016).

Enzimas, também conhecidas por catalisadores biológicos, são proteínas com diversas aplicações (Anexo 1), peso molecular na faixa de 12 kDa a mais de 1.000 kDa, necessitado ou não de cofatores, com a atividade catalítica localizada em seu sítio catalítico e associada à integridade desta conformação nativa (FABER, 2011; LEHNINGER *et al.*, 2014). Ocupam lugar de destaque em diversas áreas, rivalizando com processos tradicionais, normalmente químicos, minimizando produtos secundários, com benefícios econômicos e ambientais (HASAN *et al.*, 2006; ANTCZAK *et al.*, 2009; NORAINI *et al.*, 2014).

Enzimas são polímeros constituídos de aminoácidos, formadas por ligações peptídicas entre os aminoácidos através de ligações do grupo amino ($-\text{NH}_2$) de um aminoácido com o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) de outro, com formação de um grupo amida ($-\text{R}_2\text{CONHR}_1-$) com liberação de água. Apesar de grande massa molecular são hidrossolúveis, por apresentarem grupos polares expostos ao meio aquoso – COOH , OH , NH_2 , SH , CONH_2 – com a estrutura descrita em termos de quatro níveis de organização (Figura 1) e sua conformação estrutural

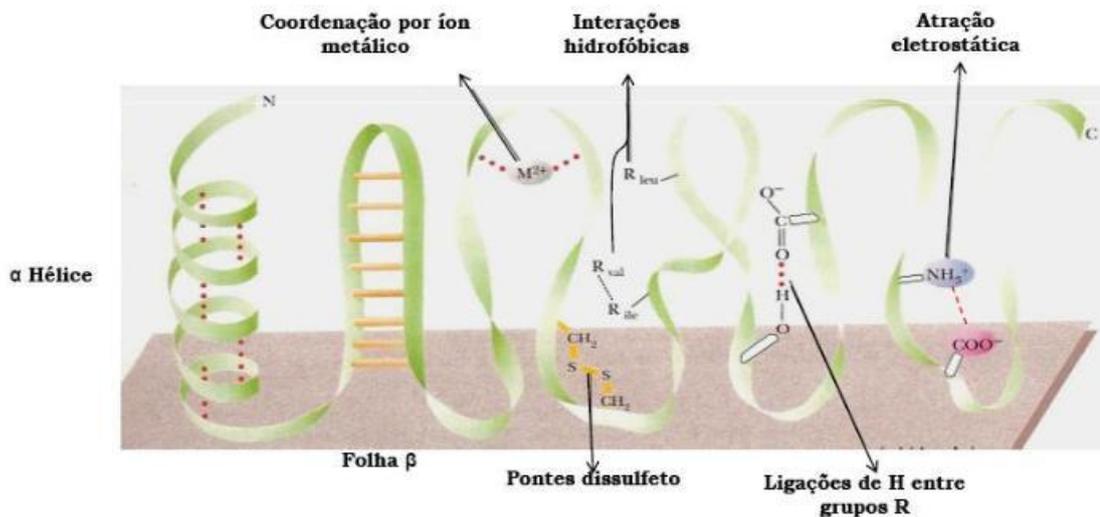
(Figura 2) (LEHNINGER *et al.*, 2014).

Figura 1: Níveis estruturais em uma proteína.



São divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam, identificadas conforme a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), com cerca de 6.000 enzimas catalogadas (Tabela 1).

Figura 2: Conformação estrutural de proteína.



Fonte: de ALMEIDA *et al.* (2013).

Tabela 1: Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB.

Nº	Classe	Tipo de Reação Catalisada	Subclasse	Enzimas listadas no NC-IUBMB*
1	Oxidoreduases	Oxidação-redução envolvendo oxigenação, ou remoção de hidrogênio.	Hidrogenases Oxidases Peroxidases	2.190
2	Transferases	Transferência de grupo aldeídico, cetônicos, acila, fosforila ou metila de uma molécula para outra.	Transaldolases Transcetolases	1.057
3	Hidrolases	Hidrólise e formação de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos, amidas, peptídeos entre outras.	Estearases Lipases Peptidases Fosfatases	1.575
4	Liasas	Adição-eliminação, formação de duplas ligações por remoção de grupos.	Descarboxilases Cetoacidoliasas Hidroliases	748
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros, incluindo migração da ligação C=C, isomerização cis-trans e racemização.	Racemases Epimerases Oxirreduases Mutases	307
6	Ligases	Formação ou clivagem de ligações C-C, C-O, C-S, C-N e ésteres de fosfato.	Sintetases	220

Fonte: IUBMB, 2018 *Atualização Junho / 2018

Todavia, em torno de 200 enzimas têm aplicação industrial, com destaque as do grupo hidrolase, por corresponderem a uma estrutura catalítica mais simples e não requerem cofatores em grande medida (BORZANI *et al.*, 2001; COELHO; SALGADO; DIAS, 2008; REZENDE *et al.*, 2016).

3.1.1 Lipase

Lipase é classificada como triacilglicerol hidrolase segundo a IUBMB, com o código EC 3.1.1.3, onde EC significa *ENZYME COMMISSION*, e seu primeiro dígito refere-se (3) ao nome da classe enzimática (hidrolase), já o segundo dígito (1) a sua classe de atuação (atua sobre ligações éster), enquanto o terceiro dígito (1) a sua sub-subclasse sobre qual ligação éster promove a reação (carboxil éster hidrolase), e o quarto dígito (3) é um número de série

dentro da sub-classe, com o nome de triacilglicerol acil-hidrolase (ARPINGY; JAEGER, 1999; IUBMB, 2018).

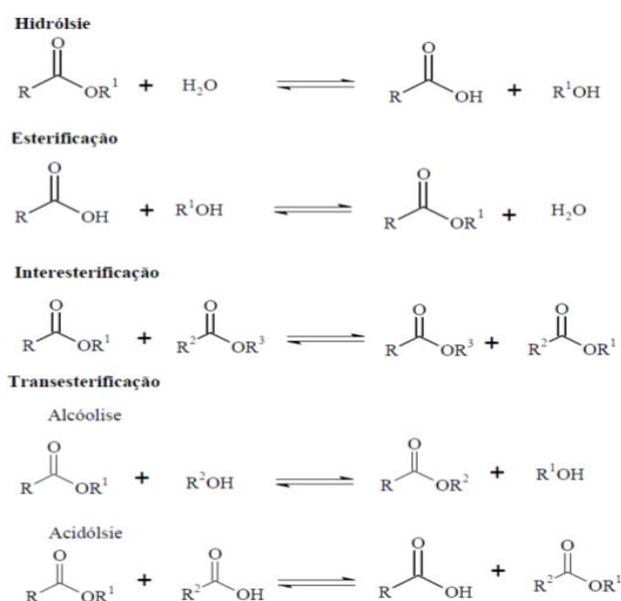
As lipases podem ter origem vegetal (CARO *et al.*, 2000), animal (MENDES *et al.*, 2012) e de fungos e bactérias (ARPINGY; JAEGER, 1999). Pela diversidade de fontes, apresentam amplo espectro quanto à massa molecular (9,4 a 195 kDa), ao pH (4,5 a 11) e à temperatura (25 a 80 °C) de operação (SHARMA *et al.*, 2011).

Enzimas com capacidade de realizar a transesterificação (frente a lipídeos e álcoois) são consideradas importantes biocatalisadores para produção de biodiesel e glicerol (JAEGER; EGGERT, 2002), assim como a transesterificação com acetato de etila que produz dois ésteres (biodiesel e 1,2,3-triacetoxipropano) (MODI *et al.*, 2007).

3.1.1.1 Reações catalisadas por lipase

As lipases catalisam não somente reações de hidrólise, mas também as reações de esterificação e transesterificação, levando, por exemplo, à síntese de diferentes ésteres carboxílicos e amidas com elevada seletividade, proporcionando um processo eficiente (reação homogênea) devido a uma maior estabilidade de lipases e relativa facilidade de recuperação do produto a partir de solventes orgânicos, em comparação com água (SHARMA *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2012).

Figura 3: Representação esquemática das reações de hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação catalisadas por lipase.



Fonte: adaptado de ALLINGER (1980).

As principais reações catalisadas por lipases estão esquematizadas na Figura 3. Dessa forma, as lipases são utilizadas como catalisadores em reações de diversas áreas industriais como detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (JAEGER e REETZ, 1998; HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; HASAN *et al.*, 2009).

3.1.1.2 Lipase proveniente de *Aspergillus oryzae*

Lipase microbiana pode ser produzida por bactérias, tais como os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (GUPTA *et al.*, 2004), enquanto para fungos *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* apresentam importância (GEOFFRY; ACHUR, 2018), e leveduras tais como *Candida antarctica* (AGUIEIRAS *et al.*, 2015). As produzidas por *Aspergillus* apresentam massa molecular entre 31 e 65 kDa, pH ótimo (5,0 – 7,0), temperatura ótima (40 – 60°C), podendo ser submetidas a processos de imobilização por adsorção, ligação cruzada e ligação covalente (CONTESINI *et al.*, 2010; AMOAH *et al.*, 2016).

Novozymes S/A (Dinamarca) foi a pioneira no desenvolvimento de lipases comerciais. Em 1988, desenvolveu uma lipase através do fungo de *Humicola lanuginosa*, porém sem aplicação comercial, sendo possível apenas quando o gene que codifica a lipase foi clonado e inserido no fungo *Aspergillus oryzae* (NOVOZYMES, 2018).

Em 1994, iniciou-se a comercialização Lipolase (TLL), originada a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* e foi também expressa como *Aspergillus oryzae*. A TLL é uma hidrolase glicosilada com um massa molecular de 30 kDa e ativa na faixa de pH (7 e 12) com ótimo em pH 8 (JAEGER *et al.*, 1999).

Em 2014, uma nova lipase solúvel chamada Eversa® Transform foi lançada pela mesma empresa com potencial para uso em processos de produção de biodiesel enzimático industrial, e em 2016 houve o lançamento da segunda geração desta lipase, a Eversa® Transform 2.0, com maior termoestabilidade tanto em enzima livre quanto imobilizada (NOVOZYMES, 2018).

A Eversa® Transform 2.0 é uma hidrolase de éster carboxílico (EC 3.1.1.3), produzida pela fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificada (NOVOZYMES, 2016; JAIN e NAIK, 2018), atuando na síntese de aromas (YAN *et al.*, 2014; KIRDI *et al.*, 2017) e de biodiesel (AMOAH *et al.*, 2016).

3.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas por apresentarem estrutura complexa e fragilidade perante condições de pH e temperatura podem inativar-se por desnaturação. Ainda por serem hidrossolúveis dificultam a sua recuperação em meio aquoso, problemas estes que podem ser minimizados através de processos de imobilização enzimática (SHARMA *et al.*, 2001; GUIÓSÁN *et al.*, 2006).

O termo enzima imobilizada foi empregado pela primeira vez na Conferência de Engenharia Enzimática realizada em Henniker (EUA) em 1971, para designar enzimas fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usadas repetida e continuamente (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000; MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização é uma ferramenta fundamental para alcançar as vantagens tecnológicas oferecidas pelas enzimas (principalmente aspectos ecológicos e de toxicidade), pois enzimas imobilizadas são normalmente mais estáveis que as solúveis, apresentando grande interesse industrial e diversas metodologias de obtenção (Anexo 2), podendo ser facilmente recuperadas e reutilizadas em várias bateladas, permitindo fácil controle do processo (formação de menos subprodutos), com redução do volume reacional e utilização de diferentes configurações de reatores (MATEO *et al.*, 2002; GUIÓSÁN *et al.*, 2006; SHELDON e van PELT, 2013).

Outra vantagem é o ganho de estabilidade que a enzima imobilizada apresenta (térmica, estocagem) a qual, geralmente, é superior em relação à enzima livre (MATEO *et al.*, 2003). Enzimas estabilizadas termicamente apresentam uma série de vantagens, pois em altas temperaturas a conversão é maior (cinética de reação), a contaminação do meio pela ação microbiana e a viscosidade são menores e a solubilidade de substratos é maior (TARDIOLI *et al.*, 2003). Enzimas imobilizadas e estabilizadas são atualmente muito utilizadas como biocatalisadores industriais (LOPÉZ-GALLEGO *et al.*, 2005). A Tabela 2 apresenta um resumo das propriedades tecnológicas do sistema de imobilização enzimático.

Deve-se sempre considerar que a atividade da enzima seja preferencialmente mantida após a imobilização, ou seja, não deverão ocorrer alterações estruturais que levem a mudanças na composição química de seu sítio catalítico (CASTILO *et al.*, 1997; FERNADEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; REETZ; JAEGER, 1998). Um decréscimo na atividade enzimática total pode ser observado devido a alterações de sua estrutura durante a imobilização e/ou limitações de difusão, todavia um aumento na quantidade de ciclos que a enzima imobilizada apresenta compensa esta perda de atividade (REGULY, 2000). As limitações de

difusão são principalmente dependentes do tamanho e propriedades do substrato, das propriedades do material do suporte e do método de imobilização. Assim, o suporte deve fornecer adequada área de superfície, proporcionar pouca limitação na difusão e baixa deformação conformacional, sem restringir o transporte de substrato e de produto das reações enzimáticas, assim como aumentar o número de ciclos que uma enzima pode realizar (DIZGE *et al.*, 2009).

Tabela 2: Propriedades Tecnológicas do Sistema de Imobilização Enzimático.

Vantagens	Desvantagens
Reuso da Enzima	Perda ou redução de atividade enzimática
Operação facilitada do reator	Limitação disfuncional
Separação enzima produtos facilitada	Custos adicionais
Maior opção de escolha de modelo de reator	

Fonte: GUIBAN *et al.* (2006).

Em meio orgânico, as enzimas são geralmente insolúveis, o que reduz a necessidade de imobilização, entretanto muitos estudos realizados em meio orgânico empregam enzimas imobilizadas como biocatalisador. A principal razão disso é que as enzimas permanecem mais bem distribuídas no suporte do que no precipitado (PENCREACH *et al.*, 1997).

Como consequência, a catálise homogênea utilizando a enzima livre nativa torna-se, então catálise heterogênea quando biocatalisadores imobilizados são empregados, alterando os parâmetros cinéticos (FABER, 2011).

Fatores a serem considerados no processo de imobilização enzimático são: atividade global do derivado, reuso das enzimas, estabilidade enzimática, estabilidade da imobilização, atividade enzimática, resistência química, resistência térmica, produtividade, simplicidade do processo de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, características de regeneração, custos de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; GUIBAN *et al.*, 2006; GROSOVÁ *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2018).

3.2.1 Métodos de imobilização

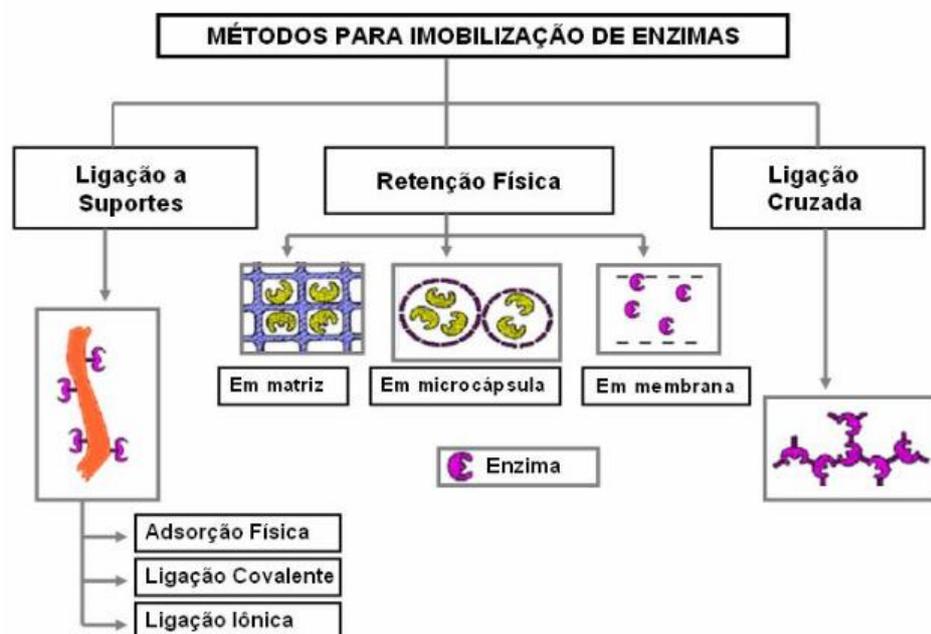
Em 1995, a IUPAC publicou um relatório técnico onde normatiza o processo de imobilização (Figura 4), classificados em:

- Confinamento da enzima dentro de uma estrutura de polímero insolúvel em água ou membrana semipermeável;
- Adsorção da enzima em suporte insolúvel em água;
- Ligação cruzada intermolecular de moléculas de enzima utilizando reagentes multifuncionais (entrecruzamento);
- Ligação covalente entre a enzima e suporte insolúvel em água.

A natureza do suporte é muito importante para a eficiência da imobilização e as principais características a serem observadas na seleção de um suporte para determinada aplicação são: deixar a enzima acessível aos substratos, área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, composição, estabilidade, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiológico, resistência mecânica, resistência à compactação em operações em altas vazões quando se utiliza reatores de leito fixo, custo, perda de atividade enzimática (VILLENEUVE *et al.*, 2000; MATEO *et al.*, 2007).

A Tabela 3 apresenta os principais suportes utilizados para imobilização.

Figura 4: Métodos para imobilização de enzimas.



Fonte: adaptado DALLA-VECCHIA *et al.* (2004).

Tabela 3: Suportes para imobilização de enzimas.

Orgânico		Inorgânico	
Natural	Ágar	Mineral	Areia
	Albumina		Argila
	Alginato		Bentonita
	Bagaço de cana-de-açúcar		Diatomita
	Celulose		Hernoblenda
	Colágeno		Pedra – Pome
	Fibra de Coco		Sílica
	Gelatina		Vermiculita
	K-carragena		
	Quitosana		
Sintético	Eupergit C	Fabricado	Alumina
	PHBV Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)		Cerâmica
	Poliacrilato		Nano partícula de Fe ₃ O ₄
	Poliamida		Óxido de ferro
	Poliuretano		Sílica com porosidade controlada
	Poliacrilamida		Vidro com porosidade controlada
	Cloreto de polivinila		Zircônia

Fonte: adaptada de MACARIO *et al.*, 2007; PALLA *et al.*, 2011; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; SHEN *et al.*, 2016; GRIGORAS, 2017.

Dada à variabilidade de fatores (método e suporte), pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte que possa ser considerado de aplicação universal (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2017).

Lipases têm sido imobilizadas em diferentes suportes de natureza orgânica e inorgânica empregando diferentes métodos de imobilização tais como adsorção física, confinamento em matrizes poliméricas ou encapsulação em membranas poliméricas, ligação covalente pelo uso de agentes multifuncionais ou por reticulação (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; GUIBAN *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2007).

3.2.1.1 Imobilização por Adsorção Física

A imobilização por adsorção física é o método mais antigo para imobilização de enzimas, de fácil preparação e possibilita o reuso do suporte causando pouca influência na conformação da enzima, e isso o torna economicamente atrativo. As enzimas são imobilizadas à matriz por meio de diferentes tipos de interações fracas (de baixa energia), tais como

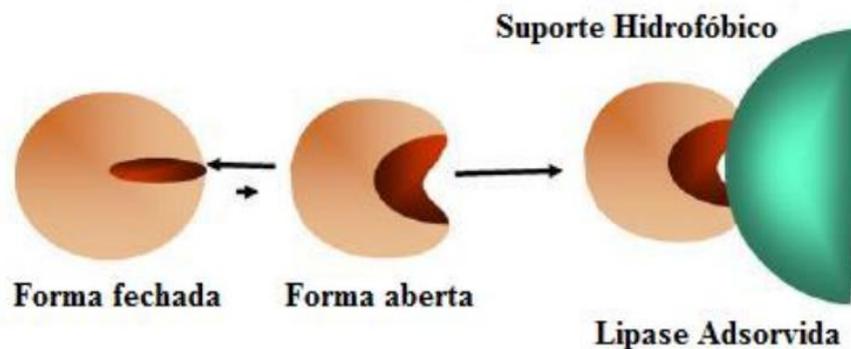
interações eletrostáticas entre cargas opostas da enzima e superfície do suporte, hidrofóbicas, van der Waals, e até as mais energéticas como ligações de hidrogênio e iônicas (entre grupos amínicos e carboxílicos da enzima e um grupo reativo da superfície do suporte), portanto as forças de interação entre a superfície proteica e a superfície do suporte no método da adsorção são complexas e envolvem múltiplos tipos de formação de ligações. Por utilizar ligações menos específicas, obtêm-se preparações enzimáticas com atividades catalíticas elevadas e rendimentos de imobilização também elevados (GUISAN, 2006; MATEO *et al.*, 2007).

O método consiste na exposição da solução enzimática ao suporte sob condições apropriadas, tais como, pH, natureza do solvente, força iônica da solução, quantidade de enzima, tempo de contato e temperatura, separando a enzima imobilizada por centrifugação ou filtração. (HALLING *et al.*, 2005; RUEDA *et al.*, 2016). Se aplicado em reação orgânica, onde as forças envolvidas são menores e nestas condições a enzima é insolúvel no meio apolar, o imobilizado produzido por adsorção física pode apresentar vantagens tecnológicas (SECUNDO *et al.*, 2008).

A falta de criação de ligações covalentes e a fraca interação suporte/enzima é a principal limitação da técnica, pois apresenta influência bastante acentuada das condições ambientais promovidas pelo meio na capacidade de retenção das enzimas no suporte, principalmente as relacionadas com concentração iônica, pH, que poderão ocorrer durante a utilização da preparação enzimática no meio reacional. A principal desvantagem deste tipo de imobilização é que as ligações podem ser rompidas com facilidade se houver variação do pH ou da força iônica, causando a dessorção da enzima. Entretanto, a estabilidade operacional e a faixa ótima de pH da enzima adsorvida no suporte (derivado enzimático) podem ser melhoradas através da adição de ligações cruzadas adicionais, utilizando um reagente bifuncional, como o glutaraldeído (GUIDINI *et al.*, 2010; RUEDA *et al.*, 2016).

Entretanto, devido ao seu mecanismo de ativação interfacial, as lipases podem ser seletivamente imobilizadas sobre superfícies hidrofóbicas, podendo-se obter em uma única etapa purificação, ativação e estabilização da enzima (BASTIDA *et al.*, 1998). A adsorção interfacial envolve regiões hidrofóbicas que circundam o sítio ativo da enzima e a face interna da “tampa”. Portanto, lipases adsorvem-se a superfícies hidrofóbicas com a tampa aberta (forma ativa), tornando o sítio catalítico acessível a pequenos substratos, mesmo que este esteja voltado para o suporte conforme descrito na Figura 5 (VERGER *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Figura 5: Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos.



Fonte: MATEO *et al.* (2007).

Há outros métodos de imobilização na literatura em que ocorra uma interação física entre suporte/enzima, como por exemplo, a imobilização por ligação iônica.

3.2.1.2 Imobilização por Ligação Iônica

O princípio envolvido no método de imobilização por ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido através de grupos com cargas opostas, que contém resíduos para troca iônica. A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente. Quanto maior a densidade de carga da superfície na matriz, maior seria a quantidade de enzima ligada. As vantagens apresentadas são: possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo, simplicidade e suavidade do método, disponibilidade de suportes, pouca mudança conformacional na enzima, não deletério para a maioria das enzimas e obtenção de enzimas imobilizadas com alta atividade (FERNANDES *et al.*, 2006).

O procedimento deste método é feito da mesma forma que no processo de adsorção física. Como desvantagem neste método também pode haver a liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio, visto que há total dependência destes parâmetros para esta metodologia de imobilização (GUISAN *et al.*, 2006). Os suportes utilizados podem ser inorgânicos ou orgânicos, destacando-se as resinas de troca iônica, preparadas principalmente a partir de matrizes orgânicas, com grupos trocadores de íons, podem ser classificados como aniônicos ou catiônicos (de ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

3.2.1.3 Imobilização por Ligação Metálica

Baseia-se em imobilizar enzimas empregando compostos de metais de transição ou óxidos metálicos precipitados a partir de seus sais, para ativar a superfície de suportes orgânicos ou inorgânicos. Esse método é baseado na propriedade de quelação dos metais de transição, que podem ser usados para ligar enzimas. Embora o tipo de ligação seja parcialmente covalente, observa-se o desprendimento da enzima do suporte em operações de longa duração. Suportes orgânicos como papel de filtro, serragem, quitina e celulose e, inorgânicos, como celite, lã de vidro, alumina e sílica têm sido utilizadas neste processo de imobilização (LAMBRECHT *et al.*, 1987).

Os sais metálicos mais utilizados nos processos são: $TiCl_3$, $TiCl_4$, $Ti_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$, $FeSO_4$, $ZnCl_4$, $SnCl_4$, $SnCl_2$ e VCl_3 . A técnica consiste em umedecer o suporte com uma solução metálica, secá-lo, lavá-lo para remover o excesso de sal e colocá-lo em contato com a solução de enzimas, normalmente no pH ótimo da enzima. Contudo as estabilidades conseguidas com tais catalisadores têm sido baixas devido à perda de enzimas para a solução, com prejuízos à sua reprodutibilidade (KENNEDY; KALOGERAKIS, 1980; LAMBRECHT *et al.*, 1987).

3.2.1.4 Imobilização por Ligação Cruzada

Baseado na formação de ligações covalentes entre as enzimas por ação de reagentes bifuncional (glutaraldeído) ou multifuncional, conduzindo a agregados enzimáticos tridimensionais insolúveis no meio aquoso, podendo utilizar suportes como gelatina. Este reage, principalmente com os grupos amina dos resíduos de lisina das enzimas, formando uma ligação imina (GUISAN *et. al.*, 2006).

A enzima reticulada entre si é considerada um derivado enzimático isento de suporte (CAO *et al.*, 2003). Vários agentes de reticulação são conhecidos e podem ser utilizados, porém o glutaraldeído (FERNANDEZ- LAFUENTE, 2010; CHEN *et al.*, 2017) permanece como uma das fontes mais baratas e versáteis (SHELDON *et al.*, 2006).

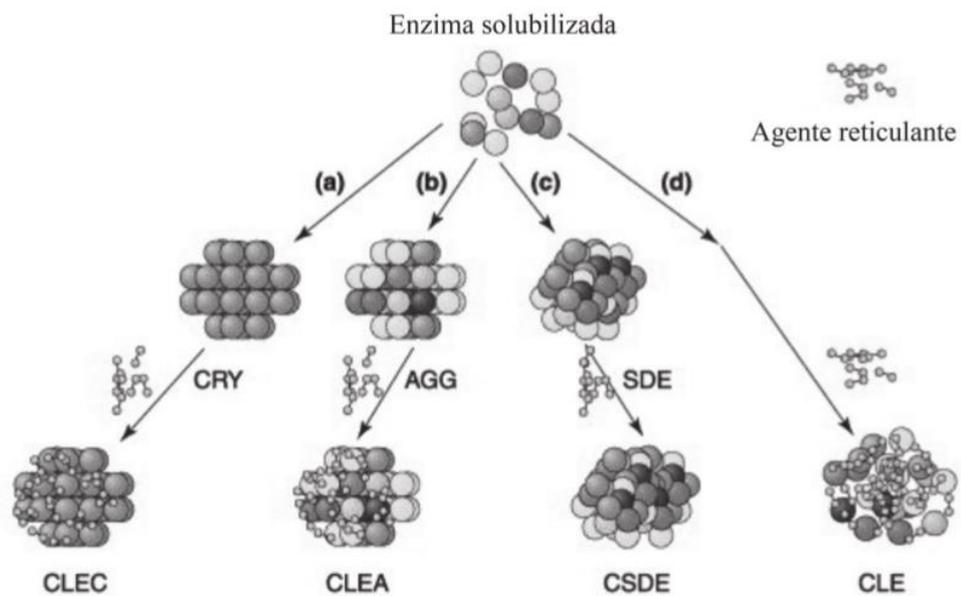
A reação entre glutaraldeído e a enzima é altamente dependente das concentrações da enzima e do agente reticulante, do pH, da força iônica da solução, da temperatura e do tempo de reação. As condições de reação são relativamente severas, afetando em alguns casos a conformação do sítio ativo da enzima (CAO *et al.*, 2003).

A principal vantagem do método de ligações cruzadas é a preparação de enzimas imobilizadas em diferentes formas, tais como géis enzimáticos, membranas enzimáticas e

derivados adsorvidos em monocamadas, ligados a polímeros. As principais desvantagens do método são a frequente e inevitável inativação da enzima, causada por modificação química e a natureza gelatinosa desses derivados enzimáticos. Frequentemente a ligação cruzada é usada em combinação com outros métodos de imobilização, por exemplo, para estabilizar preparações de enzimas imobilizadas por adsorção física, por entrelaçamento e outras combinações de métodos (CAO *et al.*, 2003).

A Figura 6 apresenta quais são os tipos de imobilização enzimática por ligação cruzada.

Figura 6: Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta.



CRY, cristais de enzima; **AGG**, agregados enzimáticos; **SDE**: enzima atomizada; **CLEC's**, cristais de enzima reticulados; **CLEA's**, agregados enzimáticos reticulados; **CSDE's**, enzimas atomizadas reticuladas; **CLE's**, enzimas solubilizadas reticuladas.

Fonte: modificada de CAO *et al.* (2003).

Uma alternativa para imobilizar enzimas seria a produção de camadas de suporte envolvendo a enzima, deixando a mesma livre dentro da matriz polimérica, conforme será abordado no seguinte item.

3.2.1.5 Imobilização por Entrelaçamento

A imobilização por entrelaçamento (aprisionamento, envolvimento ou oclusão, confinamento ou encapsulação) envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno das enzimas a serem imobilizadas sem a ocorrência de reação entre enzima e suporte, portanto um processo de retenção física e não há perda de atividade devido à inativação ou distorção do sítio ativo, como frequentemente é observado na imobilização por ligação covalente (MARCONI, 1989; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). A enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada e à medida que a polimerização prossegue a matriz (poliacrilamida, alginato, poliuretano, etc) forma-se em torno da enzima com tamanho de poros a permitir que as moléculas de substratos e produtos de pesos moleculares adequados possam se difundir através e dentro da rede polimérica (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; BRADY *et al.*, 2009).

As enzimas têm sido imobilizadas dentro de microcápsulas, lipossomas, fibras e matrizes constituídas de diferentes materiais produzidas especialmente pela técnica sol-gel (BRADY *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Outra vantagem da utilização desse método é o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional (solventes), minimizar os efeitos de inativação com pouca alteração nas propriedades das enzimas. Além disso, é um método de imobilização fácil de proceder e pode ser empregado para imobilizar um ou mais tipos de enzimas com qualquer grau de purificação e as matrizes estão disponíveis em várias formas (MARCONI, 1989; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; BRADY *et al.*, 2009).

Como desvantagens, têm-se as dificuldades associadas como o controle do tamanho dos poros do suporte, a desorção da enzima, substratos e produtos de pequena massa molecular podem ser usadas para minimizar limitações de transferência de massa pelos poros da matriz, necessitando altas concentrações de substratos a fim de diminuir esta influência negativa. Requer equilíbrio delicado entre as propriedades mecânicas da matriz e seu efeito sobre a atividade enzimática e transporte de massa, pois a difusão de produtos e reagentes pode ser o limitador da velocidade reacional deste sistema suporte/enzima, assim como muitos precursores utilizados para a polimerização das matrizes podem inativar as enzimas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; BRADY *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

3.2.1.6 Imobilização em Membranas

A enzima ou até mesmo células podem ser imobilizadas na superfície da membrana permeável de ultrafiltração permitindo a passagem do substrato e do produto. Uma derivação deste método promove o aumento da cadeia enzimática por adição de polímero sem torná-la insolúvel e evitando a passagem da enzima pelos poros. Pode ser utilizada em associação com os métodos por inclusão, gelificação, adsorção física, ligação iônica ou covalente, ou por ligação cruzada, a adsorção tem melhor oportunidade de reuso do suporte e pode dessorver enzimas (PALAI *et al.*, 2016).

As propriedades superficiais de uma membrana podem ser alteradas, por exemplo, para reduzir a adsorção ou introduzir grupos específicos que podem ser utilizados para melhorar a afinidade das membranas. A modificação também pode ser usada como um método para alterar as propriedades de separação de um material (MULDER, 1996). Muitos tipos de membrana têm sido usados em reações enzimáticas (EL-MASRY *et al.*, 2001; VASILEVA *et al.*, 2012; GÜLEÇ, 2013; PALAI *et al.*, 2014; PALAI *et al.*, 2016; VASILEVA *et al.*, 2016; MOHAMED *et al.*, 2016).

A principal vantagem deste método de imobilização é a ausência de limitações de transferência de massa (fato de que a enzima encontrar-se sob a forma livre na solução) e a ampliação conveniente pela adaptação da área de superfície da membrana disponível. Além disso, certo nível de separação do produto também é alcançado juntamente com a conversão biocatalítica em biorreatores enzimáticos com membrana (EBRAHIMI *et al.*, 2010). Normalmente, as separações de membrana têm a vantagem de exigir apenas uma quantidade limitada de energia, porque não há mudança de fase envolvida em tais processos (JOCHEMS *et al.*, 2011), tendo como principal limitação problemas com fouling (PALAI *et al.*, 2014).

3.2.1.7 Imobilização por Ligação Covalente

Ligação covalente ocorre com a inclusão de grupos ativos (ligantes) no suporte desejado com condições de reação normalmente severas. Posteriormente ocorrerão ligações covalentes entre os aminos terminais, resíduos de lisinas ou grupos funcionais específicos da enzima (Tabela 4) com os grupos ativos (ligantes) do suporte observando as condições para que ocorra a ligação covalente aconteça (BABAKI *et al.*, 2015; KNEZEVIC *et al.*, 2006). Com a utilização de glutaraldeído como agente de ligação, a interação enzima-suporte é uma reação amino (lisina) – aldeído (glutaraldeído) produzindo uma base instável de Schiff (-CH=N-) (GUISÁN, 1988).

Tabela 4: Grupamento funcional da enzima com potencial de ligação covalente ao suporte funcionalizado.

Grupamento Funcional Enzima	Aminoácido
Amino	Lisina e Arginina
Tiol	Cisteína
Himidazol	Histidina
Indol	Triptofano
Fenol	Tirosina
Hidroxila	Serina e Treonina
Carboxila	Ácido Aspártico e Ácido Glutâmico
Sulfidrila	Cisteína

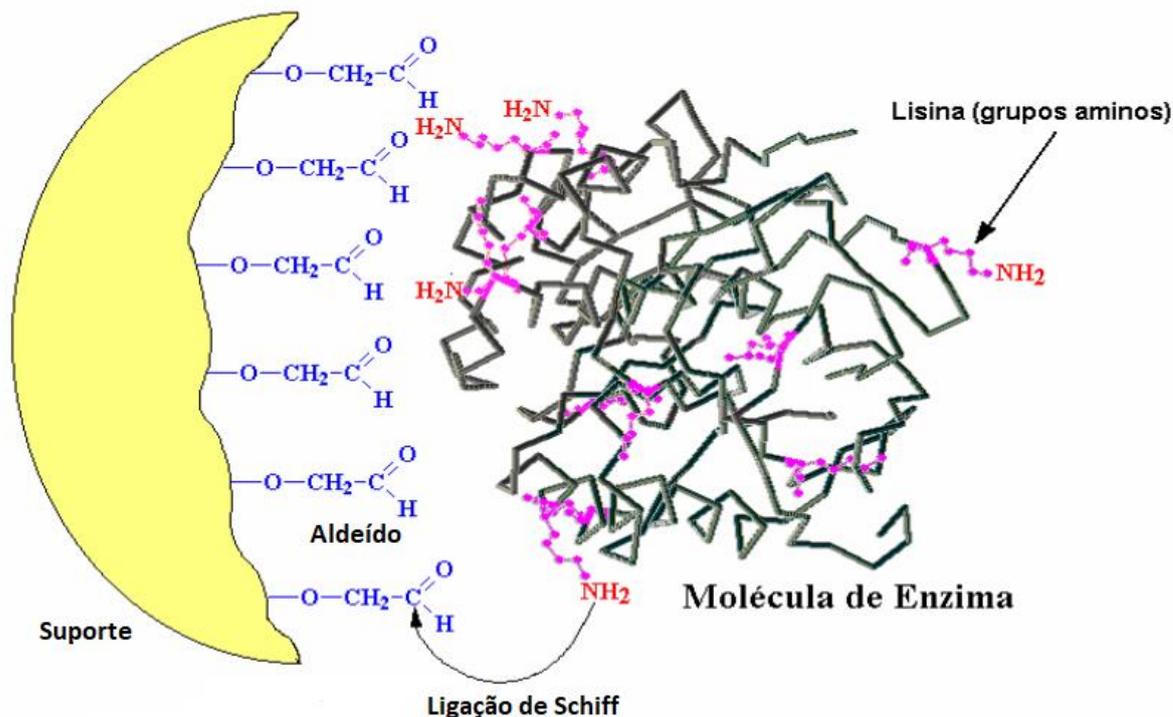
Fonte: MATEO *et al.* (2007).

A ligação covalente de enzimas a suportes sólidos pré-existentes é uma das estratégias mais estudadas e utilizadas devido, principalmente, as seguintes propriedades conferidas aos derivados enzimáticos obtidos por este sistema (GUISÁN, 1988; BLANCO e GUISÁN, 1989):

- a) Caráter covalente (ligação forte), portanto a estabilidade da ligação é de tal forma que não há perda de enzima para a solução, mesmo na presença de substratos ou soluções de alta força iônica.
- b) Baixa ocorrência de dessorção da enzima para uma vasta gama de condições operacionais, então a carga enzimática permanece constante após a imobilização.
- c) Fácil manipulação do derivado, e com isso a modificação das propriedades químicas ou catalíticas podem ser favoráveis (alteração do pH e da temperatura ótima, por exemplo).
- d) Os derivados podem ser utilizados em reatores contínuos, empacotados, de leito fluidizado ou tanque agitado.
- e) Estabilização adicional que se pode obter quando a interação for multipontual (Figura 7), levando a uma maior resistência à desativação por efeito de temperatura, solventes orgânicos ou pH. Isto ocorre devido às múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte reduzirem a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas, reduzindo assim as possibilidades de desnaturação da enzima.

As principais modificações químicas em suportes são realizadas utilizando-se agentes bifuncionais, como por exemplo: epícloridrina, glutaraldeído, glicidol (ADRIANO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008).

Figura 7: Esquema representativo de imobilização de enzimas em suportes com aldeídos.



Fonte: GUIÁN (1988).

O glutaraldeído é uma pequena molécula com alta reatividade promovendo ligação estável entre grupos amina de suportes e resíduos de amina de proteínas, além de outros reagentes como brometo de cianogênio, carbodimida com suas reações características (ELKAOUTIT *et al.*, 2011). A ativação de suportes com glutaraldeído é uma das mais populares técnicas para imobilizar enzimas e, em alguns casos, ela permite ainda melhorar a estabilidade enzimática devido às ligações multipontuais ou ligações entre as subunidades da enzima na imobilização. Entretanto, o glutaraldeído deve ser manuseado com cuidado, pois é um composto neurotóxico (ANVISA, 2007).

A ligação da enzima deve envolver qualquer grupo químico que não seja essencial à atividade catalítica, o que significa que o sítio ativo não deve ser afetado pela imobilização de maneira significativa em sua conformação, pois conduzirá à diminuição da atividade catalítica. É recomendado que o processo de imobilização ocorresse na presença do substrato ou de um inibidor competitivo de forma a proteger grupamentos funcionais do sítio ativo na matriz do suporte (PALOMO *et al.*, 2005).

Uma característica deste processo é que a reação enzima-suporte é muito rápida e facilmente hidrolisável. A ligação unipontual enzima-suporte é reversível, mas a imobilização torna-se irreversível quando ocorre através de dois ou mais pontos de ligação (GUIÁN, 1988). Ligações covalentes multipontuais podem aumentar a rigidez da estrutura

tridimensional da enzima (podendo diminuir a atividade enzimática por causa desta rigidez), por conseguinte, aumentar a estabilidade da enzima imobilizada frente a diferentes agentes inativantes, tais como, temperatura, pH, solventes orgânicos, entre outros (MATEO *et al.*, 2007).

A grande variedade de reações de ligação e de matrizes com grupos químicos capazes de participar diretamente ou de serem ativados para formar as ligações faz com que esse método seja de aplicação quase geral. Infelizmente, na maioria dos casos, a estrutura da enzima não é conhecida, de forma que fica difícil estabelecer regras gerais para a imobilização. Os quatro principais fatores para imobilização por processo covalente são (GUISÁN *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2007):

a) *Grupo funcional da proteína adequado para a ligação covalente em condições brandas de reação:* levando-se em consideração a reatividade dos grupos e a estabilidade da ligação formada, o resíduo de aminoácidos mais convenientes para se ligar a suportes são em ordem decrescente: Lys, Cys, Tyr, His, Asp, Glu, Arg, Trp, Ser, Thr e Met (imagens na Tabela 18). Os restantes dos aminoácidos, devido a seu caráter hidrofóbico, não se encontram expostos para o exterior da superfície proteica, e não podem intervir na ligação covalente.

Para a imobilização são usados os grupos aminos, presentes na enzima quando desprotonados, são muito reativos atuando como átomos com carga positiva localizados na superfície da enzima (MATEO *et al.*, 2002), portanto o pH do meio determinará se um aminoácido estará protonado ou não (LEHNINGER *et al.*, 2014). As razões para escolher os grupos aminos dos resíduos de lisina da enzima e o grupo NH₂ terminal para a imobilização (GUISÁN; 1988):

- i) A maioria das enzimas apresenta muitos resíduos de lisina superficiais que geralmente não estão envolvidos no centro catalítico, e,
- ii) Os grupos amino são polares e estão geralmente expostos ao meio na superfície da enzima.

b) *Reações de acoplamento enzima – suporte:* a reação é normalmente feita submetendo-se o suporte, previamente ativado, a uma solução de enzima, em condições brandas. As principais classes de reações de acoplamento são: diatomização, formação de amida e formação de Base de Schiff, que é uma imina, produto da reação entre aldeído (suporte) com uma amina (enzima), com o pH do meio ser um parâmetro importante (BLANCO e GUISÁN, 1988; VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

c) *Escolha de um suporte adequado para ligação covalente*: um parâmetro bastante relevante à possibilidade de interação enzima-suporte, seja ela mono ou multipontual é o grau de ativação do suporte, ou seja, a densidade de grupos reativos (aldeído) na superfície do suporte. A densidade de grupos aldeídos na superfície do suporte irá determinar as possibilidades de alinhamentos corretos entre os grupos amino da enzima e os grupos aldeídos do suporte.

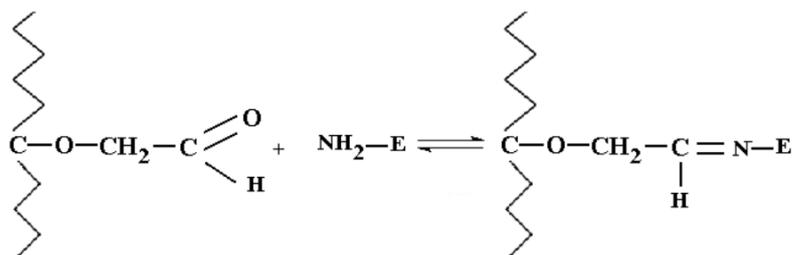
O controle da ativação do suporte permite controlar a intensidade das reações da enzima com o suporte e é possível também reduzir o grau de ativação para níveis desejados, pois elevada ativação pode acarretar distorção da enzima na imobilização. O decréscimo da concentração de grupos aldeído no suporte promove uma redução da estabilidade do derivado e na velocidade de imobilização, por consequência um baixo rendimento de imobilização. Para tempos de imobilização curtos, a estabilidade da enzima imobilizada terá um comportamento similar à da enzima solúvel (BLANCO e GUIÁN, 1988).

d) *Tempo de contato entre enzima e suporte*: Outro fator importante no processo de imobilização é o tempo de contato da enzima com o suporte, que podem favorecer a produção ou quebra da ligação covalente. Imobilização em pH alcalino e com suporte altamente ativado pode ser extremamente rápido, podendo atingir curtos períodos de imobilização com produção de pelo menos 2 ligações, mas a estabilização das ligações entre enzima e o suporte leva um tempo maior para a sua estabilização completa. Os grupos amino situados na superfície da proteína não estão alinhados com os grupos aldeídos da superfície do suporte, ou seja, a enzima e o suporte ativado não são estruturas que se completam. Quando a enzima, já imobilizada, continua a interagir com o suporte ativado, novos e corretos alinhamentos entre os grupos da enzima e os grupos aldeídos do suporte são formados e esses alinhamentos quando é produzida, a subsequente ligação química é muito rápida e irreversível (ADRIANO *et al.*, 2008). Este mecanismo para estabilização da enzima por ligação covalente multipontual em suporte ativado está de acordo com a dependência observada da estabilização do derivado com o tempo de imobilização. A formação de alinhamentos adicionais amino-aldeído deve ser mais lenta do que o primeiro processo de imobilização (reação da enzima solúvel com o suporte ativado), e isto envolve a dependência entre a estabilidade do derivado final e o tempo de contato entre a enzima já imobilizada e o suporte ativado (MATEO *et al.*, 2007).

Conclui-se, então, que a estabilidade dos derivados resultantes aumenta com o tempo de contato entre a enzima solubilizada e o suporte ativado. Sabe-se que quanto maior a temperatura maior a velocidade da reação, pois o aumento de temperatura provoca um aumento nos movimentos vibracionais da molécula de proteína, tornando-a mais flexível e

assim possibilitando alinhamentos corretos enzima-suporte ou até mesmo a quebra desta ligação. Assim, a quantidade de base de Schiff (Figura 8) formada entre grupos aldeído no suporte e amino na enzima depende do equilíbrio entre produção e rompimento da ligação a altas temperaturas (BLANCO e GUISÁN, 1988).

Figura 8: Reação enzima-suporte - Formação da Base de Schiff.



Fonte: adaptado de VOLLHARDT; SCHORE (2004).

A produção do sistema enzima-suporte pode ser descrito em três etapas:

- i) Produção ou aquisição do suporte;
- ii) Adição de grupos funcionais no suporte que fiquem livres para reação entre a enzima e o grupo funcional ligado ao suporte;
- iii) Reação entre grupos funcionais da enzima e os grupos funcionais livres do suporte. No caso da reação do glutaraldeído com a enzima é produzida uma base de Schiff.

No caso do estudo em questão, a primeira e segunda fase do processo de imobilização serão realizados simultaneamente com a adição de glutaraldeído ao meio reacional previamente a síntese do suporte, que é a espuma de poliuretano (EPU). É uma inovação tecnológica devido a não encontrar esta metodologia na literatura, simplificando e reduzindo custos de imobilização enzimática.

3.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

A tecnologia de imobilização de enzimas envolve basicamente a escolha de características desejáveis da enzima, suporte e método de imobilização, que resultem num derivado enzimático ativo e estável. No entanto, não há um método geral que possa ser aplicado para a imobilização de qualquer enzima. Tradicionalmente, a abordagem usada é a de tentativa e erro, até que um sistema satisfatório tenha sido alcançado (POPPE *et al.*, 2015).

Uniformidade de tamanho de poros é uma necessidade dos suportes enzimáticos, visto

que uma falta de uniformidade nos tamanhos de poros permite que substratos menores possam penetrar, enquanto os substratos maiores irão obstruir os canais, retardando e diminuindo a eficiência das reações. Deste modo, uma distribuição de tamanho de poro não homogêneo interfere não apenas na otimização de carga proteica sobre as superfícies internas, mas também na difusão de substratos e/ou produtos (BLANCO *et al.*, 2004).

Outra propriedade importante dos suportes de imobilização é a sua hidrofobicidade. Suportes com superfície hidrofóbica são muito interessantes para imobilização de lipase, pois sob baixa força iônica obtém-se a ativação da enzima pelo seu sítio ativo (interface hidrofóbica) (BLANCO *et al.*, 2007; dos SANTOS *et al.*, 2015).

Os suportes para imobilização de enzimas devem apresentar como principais características (GUISÁN, 1988; CAO, 2005; LOPÉZ-GALLEGU *et al.*, 2005; FABER, 2011):

- a) Elevada faixa de área superficial;
- b) Permeabilidade a substratos e produtos;
- c) Estabilidade mecânica, química e térmica;
- d) Rigidez mecânica;
- e) Insolubilidade em água e hidrofobicidades;
- f) Tamanho e forma adequados;
- g) Inerte ao ataque microbiano;
- h) Regenerabilidade;
- i) Manter forma e tamanho da partícula durante o uso;
- j) Apresentar pouca compactação em operações de leito fixo com altas taxas de escoamento;

Suportes que serão ativados com glutaraldeído devem ser preparados no momento da utilização, pois o grupo reativo tem baixa estabilidade (SANTOS *et al.*, 2015).

No presente trabalho, o método de ligação covalente será empregado na imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0. O suporte utilizado é a EPU (Espuma de Poliuretano Expandido) com funcionalização *in situ* utilizando o glutaraldeído como agente de ligação entre enzima e espuma, participando do processo de polimerização. Com isso tem-se uma etapa a menos no processo de imobilização de lipase, que normalmente ocorre a produção do suporte e posteriormente a funcionalização do mesmo com grupos funcionais livres (aldeídos neste caso) para realizarem a ligação covalente com grupos amina desprotonados da enzima, produzindo uma imina, mais conhecida por base de Schiff.

O suporte escolhido (EPU) apresenta muitas das características acima citadas, portanto adequado ao processo de imobilização enzimático e para este trabalho há a necessidade de otimização de formulação da espuma visto que o glutaraldeído participará do meio reacional,

e após esta etapa o suporte estará pronto para a imobilização por ligação covalente.

Para tanto é necessária uma revisão sobre o polímero do suporte (PU) e seus mecanismos de reação a fim de poder construir estratégias para otimização de formulação do suporte funcionalizado com o glutaraldeído como agente de ligação entre o suporte e a enzima utilizando o grupo carbonila.

3.4 POLIURETANOS (PU)

O PU pode ser formado por poliadição ou policondensação via grupos funcionais presentes nos monômeros, como carbonila, amina, carboxila e hidroxila (MICHAELI *et al.*, 1995).

A policondensação ocorre em duas etapas:

- i) Primeiro são separados elementos funcionais;
- ii) Forma-se água com o crescimento da macromolécula, sendo necessário a separação da água do meio reacional para a continuidade da reação.

O mecanismo é heterolítico com velocidade lenta da reação, sem a formação imediata do polímero e grau de polimerização médio na ordem de 10^4 (MICHAELI *et al.*, 1995; MANO; MENDES, 1999)

A Poliadição é similar a policondensação, com 3 etapas (iniciação, propagação e terminação), sem perda de água:

- i) Existe um terminal de molécula com um átomo de hidrogênio facilmente separável e um terminal de molécula com uma ligação facilmente separável;
- ii) O hidrogênio separa-se e a ligação do outro grupo funcional dissocia-se;
- iii) O hidrogênio forma uma ligação com um dos elétrons da ligação dissociada. A posição de onde o hidrogênio saiu e o outro elétron da ligação dissociada forma uma nova ligação e a cadeia é ampliada.

Este mecanismo apresenta velocidade de reação rápida, com formação imediata dos polímeros com grau de polimerização alto, na ordem de 10^5 (MICHAELI *et al.*, 1995; MANO; MENDES, 1999).

Para que uma macromolécula possa originar um polímero por adição ou condensação, é essencial que sua estrutura química apresente funcionalidade igual a 2, isto é, apresente dois sítios reativos, permitindo o crescimento da cadeia, os quais podem ser iguais (Di-isocianato) ou distintos na mesma molécula (Caprolactama). Se a substância tem grupamentos funcionais que propiciem o crescimento da molécula por apenas um ponto, não é gerado polímero; se

houver dois pontos (funcionalidade da molécula igual a 2), o polímero resultante terá cadeias lineares, com ou sem ramificações e, portanto, apresentará propriedades de um termoplástico. Se ocorrer reação por 3 ou mais pontos, o polímero resultante poderá conter ligações cruzadas, apresentando o comportamento de um termorrígido, que é o caso da reação de produção de poliuretano, com as reações secundárias criando novas funcionalidades e ligações cruzadas na molécula (MANO; MENDES, 1999).

A reação de poliadição é exotérmica e a viscosidade do meio reacional cresce rapidamente, tornando cada vez mais difícil a acessibilidade do monômero aos centros ativos da cadeia em crescimento, com problemas de uniformidade das condições da reação, produzindo heterogeneidade no tamanho das macromoléculas formadas (MANO; MENDES, 1999). O Calor gerado pela polimerização pode causar problemas no uso do PU como suporte enzimático por entrelaçamento, necessitando de refrigeração do meio reacional (NYARI, 2013).

O PU apresenta algumas propriedades atrativas, em comparação com outros polímeros, tais como (MANO, 1991):

- i) Comparável: Resistência a tração, compressão, rigidez dielétrica, índice de refração, densidade, permeabilidade a gases.
- ii) Superior: Alongamento na ruptura, Flexão, Expansão térmica.
- iii) Inferior: Módulo de Elasticidade, Condutividade térmica.

As EPU's 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 abertas, interligadas em uma estrutura tridimensional, permeáveis ao ar, reversíveis à deformação e podem ser produzidas numa grande faixa de propriedades incluindo maciez, firmeza e resiliência (IONESCU, 2005; VILAR, 1999).

3.4.1 Histórico do Poliuretano

A produção de ligações uretânicas data de 1849, quando Wurts e Hofmann relataram pela primeira vez a reação entre um isocianato e um composto contendo grupo hidroxila. Em 1937 Otto Bayer desenvolveu o poliuretano a partir de um diisocianato que foi patenteado pela atual companhia Bayer AG de Leverkusen. É considerado um dos principais polímeros sintéticos por suas propriedades físicas e químicas diferentes e amplas aplicações (VILAR, 1999).

O poliuretano ($-\text{NHCOO}-$) é o produto da reação química entre uma molécula contendo grupo isocianato ($-\text{N}=\text{C}=\text{O}$) (di ou polifuncional), disponível nas formas aromáticas

ou alifáticas e um polioliol, possuindo hidroxilas ($-\text{OH}$) (com variação desde peso molecular, natureza química e funcionalidade) e até mesmo outros reagentes como agentes de cura ou extensores de cadeia, que contenham dois ou mais grupos reativos (MANO; MENDES, 1999). Também é possível sintetizar ligações uretânicas sem a utilização dos isocianatos, utilizando oligômeros que possuem grupos carbonatos cíclicos que devem reagir com diaminas, ou ainda reações envolvendo vinil carbonatos com aminas (ROKICK; PIOTROWSKA, 2002).

O poliuretano expandido (EPU) apresenta aplicações em colchões, estofamentos, esponjas para lavar louça, espuma leve e rígida usada no isolamento térmico (geladeiras, caminhões frigoríficos, painéis divisórios, criogenia), assim como suporte para imobilização de enzimas (MICHAELI *et al.*, 1995; CIPOLATTI *et al.*, 2015; DALLAGO *et al.*, 2015a; DALLAGO *et al.*, 2015b; NYARI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018; LIM *et al.*, 2018), o caracterizando como um material de múltiplas aplicações (CANGEMI *et al.*, 2009) por conter grupamentos diversos (aromáticos, alifáticos, cíclicos, amidas, ureia, ésteres, éteres, entre outros) (MANO; MENDES, 1999).

3.4.2 Isocianatos

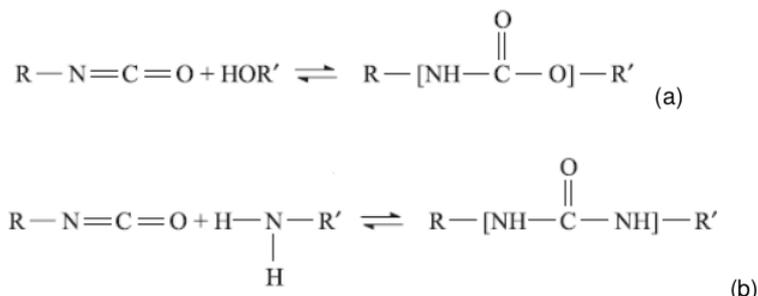
Os isocianatos ($-\text{N}=\text{C}=\text{O}$) são um dos intermediários da degradação de Hofmann da conversão de amidas a aminas, sendo possível isolá-lo ao realizar esta degradação na ausência de água (MORRISON; BOYD, 2011). É uma das classes de compostos com múltiplas ligações carbono-nitrogênio, juntamente com as carbodiimidas ($-\text{N}=\text{C}=\text{N}$) que são análogos nitrogenados dos cetenos, importantes reagentes na indústria de plásticos e polímeros (ALLINGER, 1980). O isocianato é um análogo nitrogenado do dióxido de carbono ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$), sendo o carbono *sp* da carbonila muito eletrofílico (VOLLHARDT; SCHORE, 2014).

A química envolvida na síntese de um poliuretano está baseada nas reações do grupo isocianato, altamente reativo, podendo formar dímeros, trímeros ou até carbodiimidas. Os isocianatos podem ser representados pela fórmula geral $\text{R}(\text{N}=\text{C}=\text{O})_n$ onde **R** poderá ser grupos aromáticos, alifáticos ou cíclicos e “n” representa a funcionalidade do isocianato, podendo variar de 2 (diisocianato) até 4 (poliisocianatos) (ALLINGER, 1980).

Os isocianatos são compostos em que o átomo de carbono apresenta-se como um centro deficitário de elétrons, o que os torna altamente reativos e suscetíveis a reações nucleofílicas. Reagem com compostos que apresentam na cadeia átomos de hidrogênio ativos, como grupos hidroxila de álcoois e aminas, formando grupos uretana e uréia (Figura 9). A

uretana é um derivado funcional do ácido carbônico apresentando os grupos éster e amida em sua estrutura (MORRISON; BOYD, 2011; SCHULZKE *et al.*, 2018).

Figura 9: Reações com isocianato gerando em: (a) Uretana, (b) Uréia.



Fonte: adaptado de FERKL *et al.* (2018).

A estrutura do isocianato (Figura 10) tem importância na reatividade do grupo, devido às estruturas de ressonância das duplas ligações entre o nitrogênio, o carbono e o oxigênio presentes (MORRISON; BOYD, 2011).

Figura 10: Estruturas de ressonância do grupamento isocianato.



Fonte: adaptado de MORRISON; BOYD (2011).

Quando o grupo isocianato se encontra ligado diretamente ao anel aromático o efeito da ressonância do anel induz uma elevada carga positiva ao carbono do grupo NCO, tornando-o mais reativo diante de nucleófilos como álcoois e amins. Para diisocianatos aromáticos que possuem ambos os grupos NCO no mesmo anel aromático a reatividade é dependente do efeito ativador do outro grupo substituinte. O decréscimo da reatividade é maior se um substituinte estiver presente em posição *orto* em relação ao segundo NCO. No tolueno diisocianato (TDI) o grupo NCO na posição *para* reage muito mais rapidamente do que o NCO em posição *orto*. (MORRISON; BOYD, 2011).

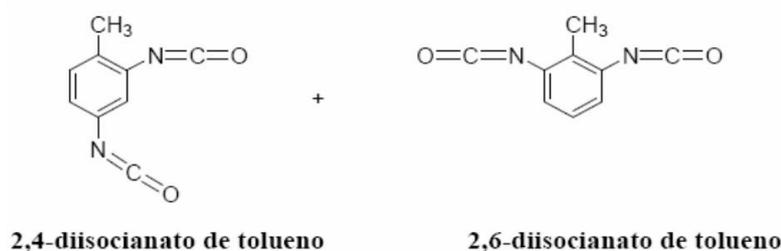
A ordem de reatividade dos diferentes categorias de compostos frente ao grupo isocianato é: amins alifáticas primárias > amins aromáticas primárias > álcoois primários > água > álcoois secundários > álcoois terciários > álcoois aromáticos > ácidos carboxílicos > ureia > uretano > amida (MORRISON; BOYD, 2011).

O isocianato mais utilizado na fabricação das espumas flexíveis é o tolueno diisocianato (TDI), formado pela mistura de isômeros 2,4 (*orto*) e 2,6 (*para*) (Figura 11) nas

proporções 80:20 ou 65:35. Também são encontrados no mercado isocianatos como o diisocianato de isoforona (IPDI), o diisocianato 1,6 hexametileno (HDI), diisocianato de 4, 4' difenilmetano hidrogenado (HMDI), diisocianato meta-tetrametilxileno (TMXDI), diisocianato de 1,5 naftaleno (NDI), isocianato difenil metileno (MDI), isocianato de polifenil difenileno (PMDI) (VILAR, 1999; SCHULZKE *et al.*, 2018).

Isocianatos podem ser prejudiciais ao ser humano e ao meio ambiente, com alguns dos principais isocianatos utilizados na produção de poliuretanos (TDI e MDI) são classificados como CMR (Carcinogênico, Mutagênico e Tóxicos à reprodução). A produção de isocianatos requer o fósforo, que é um gás letal, podendo ser produzido em processos de queima não controlada de espumas de poliuretano, com algumas regulações a fim de banir alguns isocianatos (CORNILLE *et al.* , 2017).

Figura 11: Isômeros de tolueno diisocianato (TDI).



Fonte: adaptado de VILAR (1999).

A função básica do TDI na produção da espuma flexível é reagir com a água liberando o gás carbônico, CO₂, e com o polioli (poliadição) originando a espuma (VILAR, 1999; MORRISON; BOYD, 2011; SCHULZKE *et al.*, 2018).

3.4.3 Polióis

O termo “polioli” é a abreviação para álcoois polifuncionais. São compostos oligoméricos di ou polihidroxilados, os quais, ao lado dos isocianatos, são os componentes essenciais para a formação dos poliuretanos, que se destacam pela versatilidade como polímeros em diversas áreas de ciência. Os poliois mais simples encontrados para as sínteses de poliuretanos são os glicóis como 1,4-butanodiol e 1,6-hexanodiol, conhecidos por poliois poliésteres, que por possuírem baixa massa molar resultam em segmentos poliméricos rígidos por causa da alta concentração de grupos uretânicos por unidade de cadeia do polímero

(VILAR, 1999).

Poliois apresentam fórmula geral HO–**R**–OH, onde **R** é um substituinte, como por exemplo: (–CH₂–CH₂–: Etileno glicol), (–CH₂–CH(CH₃)–: Propileno glicol), (–CH₂–C(OH)–CH₂–: Glicerol) e (–C₆H₄–C(CH₃)₂–C₆H₄–: 2,2-Di-(*p*-fenilol)-propano) (MANO, MENDES, 1999; IONESCU, 2005; CANGEMI *et al.*, 2009).

Além de polióis poliésteres são utilizados na fabricação de poliuretanos os polióis poliéteres, polioliol de óleo de mamona, polióis derivados do óleo de soja e polióis hidrocarbonetos, entre outros compostos (CLEMENTE *et al.*, 2014; OURIQUE *et al.*, 2017; AGRAWAL *et al.*, 2017; DHALIWAL *et al.*, 2018).

Poliuretanos flexíveis produzidos com polióis poliésteres alifáticos apresentam algumas vantagens em relação aos baseados em polioliol poliéter, tais como: resistência aos óleos, solventes, à oxidação, melhor resistência à tensão, ao rasgo, ao corte, à abrasão, adesão e estabilidade dimensional. Porém em relação aos poliéteres são mais sensíveis à hidrólise e à ação microbiana (VILAR, 1999).

3.4.4 Reações na produção de PU

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 diisocianato e o polioliol, não sendo representados todos os tipos de ligação que efetivamente podem fazer parte da estrutura do polímero formado. Para produzir a espuma são necessárias basicamente duas reações principais (itens 3.4.4.1 e 3.4.4.3) e duas secundárias (itens 3.4.4.2 e 3.4.4.4).

As reações secundárias que originam as propriedades tanto do PU quanto do EPU ocorrem com intermediários gerados no processo. Ambas as reações têm como reagente comum o isocianato. Os itens 3.4.4.2 e 3.4.4.4 descrevem as reações do isocianato com amina, uretano e ureia, bem como as reações secundárias (IONESCU, 2005; VILAR, 2011; CHEN *et al.*, 2018; SCHULZKE *et al.*, 2018).

Na bioquímica e biotecnologia, cientistas têm atribuído às espumas de PU características de suporte para imobilização de enzimas devido a sua resistência, versatilidade, facilidade de preparo, poder de sorção, porosidade, controle de poros durante a síntese, sua área superficial, permeabilidade, facilidade do transporte de massa, baixa toxicidade e preço (de ORY *et al.*, 2006). Por estas características, EPU é o alvo principal deste trabalho.

As propriedades dos PU's estão intimamente ligadas à morfologia apresentada pelo polímero, no qual 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 termodinamicamente incompatíveis, com conseqüente aparecimento de domínios distintos, resultando numa separação de fases (VILAR, 1999; IONESCU, 2005).

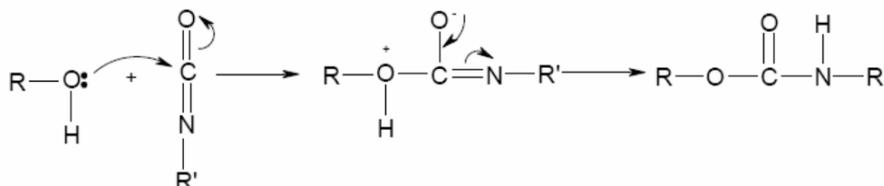
Portanto o entendimento destas reações que acontecem em seqüência e em paralelo durante a formação do EPU é de suma importância para avaliação de otimização de reagentes necessários (polioliol, isocianato e glutaraldeído) a fim de produzir EPU para realizar imobilização enzimática por ligação covalente.

3.4.4.1 Reação com álcool

A reação principal do PU é quando álcoois se adicionam aos isocianatos formando ésteres do ácido carbâmico, denominados uretanas (Figura 12), estáveis e de estrutura primordial (ALLINGER, 1980; CHEN *et al.*, 2018).

É reação é exotérmica, de velocidade moderada, liberando cerca de 24 kcal/mol por uretano formado (VILAR, 1999; IONESCU, 2005). A estrutura dos compostos tem influência direta na reatividade. Álcoois com hidroxilas primárias apresentam maior reatividade que álcoois com hidroxilas secundárias, cujo efeito estérico dos grupos vizinhos diminui a sua reatividade (ALLINGER, 1980).

Figura 12: Reação de formação da ligação uretana.



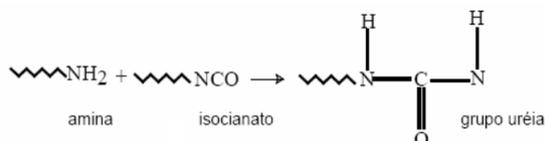
Fonte: adaptado de MORRISON; BOYD (2011).

Para acelerar esta reação e tornar o processo de produção de PU's mais produtivo, utilizam-se catalisadores, que geralmente são aminas terciárias (triétileno diamina) ou compostos organometálicos (octanoato de estanho) (IONESCU, 2005).

3.4.4.2 Reação com amina

As reações dos isocianatos com aminas formando poliuréias (Figura 13) não necessitam de catálise (IONESCU, 2005; CHEN *et al.*, 2018).

Figura 13: Reação de formação do grupo uréia.



Fonte: adaptado de (IONESCU, 2005).

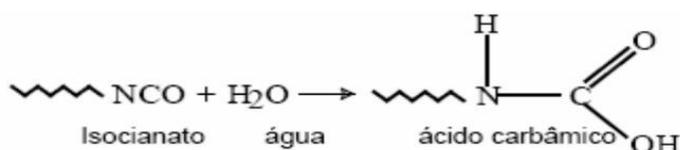
Aminas alifáticas reagem mais rapidamente do que as aromáticas de menor basicidade, desde que não haja impedimento estérico muito significativo, e a reatividade das aminas aromáticas serão menores quanto maior for a eletronegatividade dos substituintes do anel aromático analogamente ao TDI (ALLINGER, 1980).

Poliureias ficam uniformemente distribuídas pela estrutura gerando ligações de hidrogênio intermoleculares, 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 (RAMIREZ; GUPTA, 2019).

3.4.4.3 Reação com a água

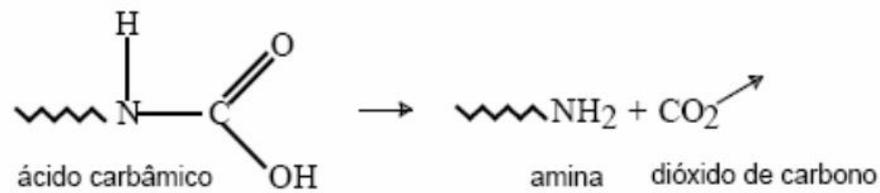
A água é a fonte necessária de hidrogênios ativos e quando reage com o isocianato libera gás carbônico e moléculas de poliureia. A reação acontece em etapas, primeiro produz-se o ácido carbâmico (Figura 14), um composto de baixa estabilidade que se decompõe em amina (depois gerando ureia conforme item 2.4.4.2) e dióxido de carbono (Figura 15) (ALLINGER, 1980). A reação é exotérmica e libera cerca de 47 kcal/mol de água consumida, com estequiometria igual a 1 mol de água para 2 mols de isocianato. Pode-se controlar a densidade das espumas, pois quanto maior o nível de água na formulação, menor será a densidade (VILAR, 1999; IONESCU, 2005; CHEN *et al.*, 2018).

Figura 14: Reação de formação do ácido carbâmico.



Fonte: adaptado de ALLINGER (1980).

Figura 15: Reação de decomposição do ácido carbâmico.



Fonte: adaptado de ALLINGER (1980).

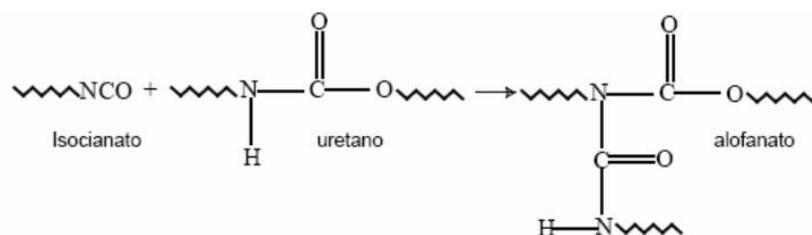
A velocidade da reação do isocianato com a água é comparável à velocidade da reação do isocianato com álcool primário, porém muito menor que a velocidade da reação do isocianato com amina. A catálise da reação de isocianatos com água é feita com o uso de aminas terciárias (IONESCU, 2005).

Ocorre a expansão do EPU e formação da estrutura celular, sendo esta etapa de extrema importância na fabricação das espumas de PU, pois a difusão de CO₂ para as bolhas de ar previamente nucleadas causa a expansão da espuma durante a reação de polimerização, responsável pelo crescimento da massa polimérica e a formação das células ou poros, onde o CO₂ é substituído por ar, devido à espuma ter células abertas (ALLINGER, 1980; IONESCU, 2005; CHEN *et al.*, 2018).

3.4.4.4 Reação com uretano e ureia

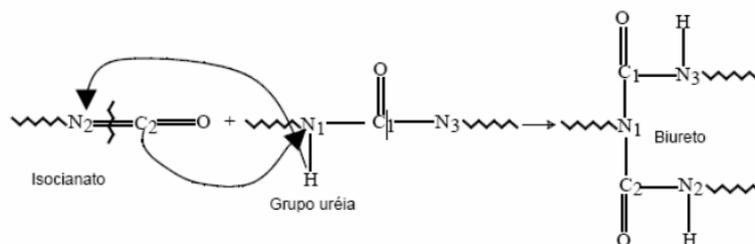
Durante a síntese, devido a reação de polimerização ser exotérmica, ocorrem reações secundárias, nas quais os hidrogênios das ligações uretânicas dos grupos uretano (Figura 16) e ureia (Figura 17) reagem com os isocianatos para a formação dos grupo alofanato e biureto. São os principais responsáveis pelas propriedades mecânicas das espumas flexíveis e pela reticulação na estrutura do polímero.

Figura 16: Reação entre isocianato e uretano produzindo alofanato.



Fonte: (VILAR, 1999).

Figura 17: Reação entre isocianato e uréia produzindo biureto.



Fonte: (VILAR, 1999).

O efeito dessas ligações pode ser verificado com o aumento da resistência à tração na ruptura e o decréscimo do alongamento na ruptura. Em uma temperatura entre 80 – 95°C ocorre a formação de biureto e o alofanato entre 120 – 140°C. 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. Estas reações são reversíveis e ocorrem em temperaturas superiores a 110°C, podendo ser classificadas como lenta e muito lenta, respectivamente, quando não catalisadas. Elas ocorrem principalmente na pós-cura dos EPU's, onde estes permanecem por longo tempo em temperaturas elevadas, como por exemplo: 22 horas a 70°C, ou dias à temperatura ambiente, dependendo do sistema empregado (VILAR, 1999; IONESCU, 2005).

3.4.5 Processo “One Shot” de produção de espumas de poliuretano

A reação envolvida na produção de um pré-polímero é a formação do uretano, e quando feita pelo processo “One Shot” ela tem que ser acelerada e balanceada com a reação de formação de ureia (item 3.4.4.2), para evitar o colapso da espuma, ou seja, evitar que sejam produzidas bolhas muito pequenas, que possam causar problemas mecânicos e até mesmo ocasionar células fechadas ou com rachaduras (VILAR, 1999; KRAITAPE ; THONGPIN, 2016).

Em escala laboratorial a síntese de espuma de poliuretano pode ser realizada por dois processos, o primeiro deles envolve duas etapas e é o mais indicado para fabricação de elastômeros e adesivos. A primeira etapa da síntese envolve uma mistura de polioliol com excesso de isocianato em atmosfera inerte levando à formação de um pré-polímero de alto peso molecular com grupos isocianatos nas extremidades, para na segunda etapa, quando é adicionada uma mistura de polioliol de baixo peso molecular (extensor de cadeia), surfatante,

catalisadores, entre outros, finalizando a formação do poliuretano (VILAR, 1999; KRAITAPE ; THONGPIN, 2016).

O segundo processo chamado de “One Shot” é o mais indicado para síntese de EPU, que é o caso do estudo deste trabalho onde é necessário a produção de um suporte de EPU para o processo de imobilização de enzimas (VILAR, 1999). Nesse processo são desenvolvidas as seguintes etapas, mostradas na Figura 18.

A etapa de mistura e dosagem está representado na Figura 18. Em um recipiente é feito uma mistura do polioliol e do catalisador, com auxílio de misturador mecânico. A primeira agitação responsável pela formação de microbolhas de ar dentro da massa polimérica que são estabilizadas pelo surfactante. Em seguida adiciona-se o isocianato e uma segunda agitação promove uma homogeneização do meio e uma maior nucleação. Esta segunda agitação se dá em torno de 1 a 20 segundos dependendo da reatividade do polioliol e da quantidade empregada de catalisador, terminando com a mudança de cor do meio reacional (VILAR, 1999; KRAITAPE ; THONGPIN, 2016).

Figura 18: Sequencia da produção de EPU via processo “One Shot”.

O diagrama mostra a evolução de um recipiente contendo reagentes em seis etapas: (a) adição de ar (b) e polioliol, água e aditivos (c) a matérias-primas (d); (e) mistura e nucleação; (f) formação de creme e início do crescimento; (g) crescimento; (h) separação de fase, suspiro e geleificação; (i) cura.

Etapas	Mistura	Creme	Crescimento	Suspiro	Cura e pós cura
Tempo	0	10 s		60 s	Horas e dias
Fenômenos Físicos	Dispersão das bolhas e reagentes	Mudança de cor	Aumento de viscosidade	Aumento das células e módulo	Aumento do suporte de carga
Fenômenos Cinéticos	Colisões de moléculas	Reações primárias (3.4.4.1 e 3.4.4.3) e secundárias (3.4.4.2 e 3.4.4.4)			Difusão
Morfologia	Mistura heterogênea	Expansão de bolhas Formação de domínios rígidos		Precipitação da poliuréia Ruptura das membranas celulares	Rigidez na espuma

Fonte: adaptado de VILAR (1999).

Após a etapa de dosagem e mistura, a massa polimérica fica saturada com o dióxido de carbono (item 3.4.4.3), dando ao líquido uma aparência cremosa, sendo esta a etapa de “creme”. Este fenômeno ocorre entre 6 e 20 segundos após a mistura dos componentes e não há formação detectável de biureto e alofanato, grupos relacionados à formação de nós em uma rede poliuretânica. Tempos de “creme” muito baixos indicam alta reatividade do polioliol ou uma quantidade excessiva de catalisador que atua no processo de formação de CO₂ (VILAR, 2011).

Quase juntamente com a etapa de “creme” ocorre a etapa de crescimento, na qual 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. Nesta fase, avalia-se a estabilidade das células e a formação da espuma. Este processo se completa entre 60 e 120 segundos após a mistura dos componentes (JANG; KRAYNIK; KYRIAKIDES, 2008).

Finalmente, na etapa de cura, a matriz polimérica, já estruturada permanece por um período mínimo de 24 horas antes de ser manuseada. Esta fase compreende o tempo no qual a espuma não apresenta mais a pegajosidade (“tack”) exterior ao toque. Podem-se utilizar estufas a temperaturas de 70 – 100°C para acelerar a cura e aumentar a sua reticulação. O tempo de cura (“cure”) é a reticulação do oligômero durante o processo de produção do artefato (VILAR, 1999; KRAITAPE; THONGPIN, 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos laboratoriais realizados nas instalações da Universidade Regional e Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI) – campus Erechim, durante a fase experimental deste trabalho.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados no presente trabalho foram:

- ✓ Acetona (CH_3COCH_3), PM (58,08 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Fmaia;
- ✓ Ácido Fosfórico (H_3PO_4), PM (97,99 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Vetec;
- ✓ Ácido Oléico ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$), PM (282,46 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Vetec;
- ✓ Álcool Etílico (Etanol 95 %) ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), PM (46,07 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Merck;
- ✓ Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), PM (137,99 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Neon;

- ✓ Glicerina ($\text{C}_3\text{O}_3\text{H}_8$), PM (92,09 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Quemis;
- ✓ Glutaraldeído, solução 50% (m/v) ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$), PM (100,12 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Vetec;
- ✓ Hidróxido de Amônio (NH_4OH), PM (35,04 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Synth;
- ✓ Hidróxido de Sódio (NaOH), PM (39,99 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Nuclear;
- ✓ Nitrato de Amônia (NH_4NO_3), PM (80,04 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Vetec;
- ✓ Sulfato de cobre II penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), PM (249,685 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Vetec;
- ✓ Tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), PM (282,1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Dinamica;
- ✓ Reagente de Schiff para microscopia Merck;
- ✓ Isocianato (Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes);
- ✓ Polioliol (Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes) .

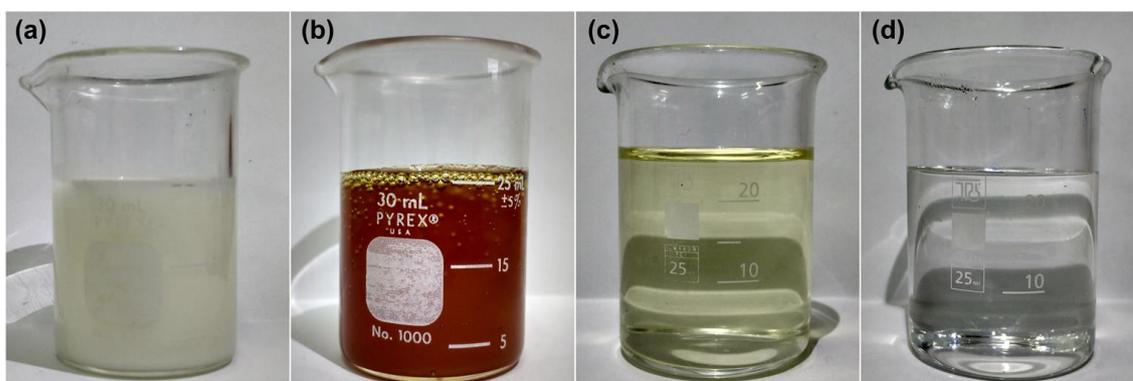
4.1.1.1 Enzima

A enzima utilizada foi a lipase em forma líquida comercialmente conhecida como Eversa® Transform 2.0 (Novozymes Latin America LTDA) de origem do fungo *Aspergillus oryzae* cedida gentilmente por uma empresa de óleos local, selecionada a fim de avaliar o potencial do EPU como suporte para imobilização pelo método de ligação covalente.

4.1.1.2 Suporte

Os monômeros comerciais Polioliol e Isocianato utilizados nesse trabalho foram produzidos para uma formulação específica para colchões e espumas injetadas para a Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes. Outros reagentes utilizados na fabricação do suporte foram a solução 50% de glutaraldeído (agente de funcionalização) e a glicerina. A Figura 19 apresenta os reagentes utilizados para elaboração da espuma de PU usado como suporte no processo de imobilização da lipase.

Figura 19: Reagentes para a produção da EPU em: (a) Polioliol, (b) Isocianato, (c) Glutaraldeído e (d) Glicerina.



Fonte: O Autor.

4.1.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste estudo foram:

- ✓ Agitador magnético com potencia 650w (Fisatom);
- ✓ Agitador orbital (Marconi MA-410);
- ✓ Balança analítica (Shimadzu);
- ✓ Colorímetro portátil (Minolta CRHOMA METER CR-400);
- ✓ Determinador de Carbono Orgânico TOC-V CSH da marca Shimadzu®
- ✓ Micropipeta (Transferpette) 100 – 1000 μ L;
- ✓ Micropipeta (Transferpette) 5 – 30 μ L;
- ✓ pH metro MA- 522 (Marconi);
- ✓ Recipiente de polipropileno (200 mL);
- ✓ Seringas de 10 mL de volume.

4.2 MÉTODOS

A sequencia das atividades planejadas para a produção de um suporte funcionalizado *in situ* com carbonila durante o processo de polimerização está descrito abaixo:

- i)** Investigar a razão volumétrica entre poliols e isocianato com a participação do glutaraldeído na polimerização;
- ii)** Classificar as quatro formas distintas de produção do suporte (razão volumétrica de poliols e isocianato determinado anteriormente com 4 volumes incorporados de glutaraldeído), com base na lixiviação do glutaraldeído e atividade do suporte;
- iii)** Otimizar os parâmetros de imobilização por ligação covalente;
- iv)** Comparar processo de imobilização por ligação covalente e por adsorção da enzima com base na atividade do suporte;
- v)** Medir a variação de cor da espuma ao longo do tempo para avaliar o efeito da adição de glutaraldeído na cor da espuma.

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram desenvolvidos em etapas, com detalhamento experimental descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Sequencia dos trabalhos experimentais.

Processo	Metodologia	Item	Resultado
Determinar razão volumétrica entre polioliol, isocianato com diferentes volumes de glutaraldeído na produção do suporte (EPU).	- 5 grupos de EPU com proporções distintas de polioliol/isocianato (mL) (7:3; 6:4; 5:5; 6:6; 3:7). - Adicionar (mL) 4 volumes de glutaraldeído 50% distintos (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0) em cada suporte.	4.2.1.1	5.1
Produzir espuma conforme resultado em 5.1, a fim de avaliar a lixiviação de glutaraldeído da espuma.	- 4 métodos de produção de espumas (7 mL de polioliol + 3 mL de isocianato) – (Tabela 7). - 4 proporções de glutaraldeído 50% (mL) distintos (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0).	4.2.1.2	NA
Determinar volume de glutaraldeído na produção do suporte com base na lixiviação do glutaraldeído.	Teste Fehling – Qualitativo	4.2.1.5	5.3
	COT – Semi-Quantitativo	4.2.1.6	
	Teste de Schiff	4.2.1.4	5.1
Classificar os 4 métodos de produção de suporte de imobilização com base na atividade do suporte. A formulação está em 5.3 (7 mL de polioliol, 3 mL de isocianato e 1 mL de glutaraldeído 50%).	Imobilização da lipase	4.2.2	5.5
	Atividade na espuma	4.2.2.1	
Otimizar do processo de imobilização por ligação covalente (pH, Temperatura e tempo), com base na atividade do suporte e atividade do meio reacional. O suporte escolhido está em 5.5.	Imobilização da lipase	4.2.2	5.6
	Atividade na espuma	4.2.2.1	
	Cinética de Imobilização	4.2.2	
Comparar métodos de imobilização por ligação covalente e por adsorção através dos parâmetros da otimização descritos em 5.6.	Imobilização da lipase	4.2.2	5.7
	Atividade na espuma	4.2.2.1	
Medir a alteração da cor da espuma em função do tempo de estocagem e da quantidade de glutaraldeído 50% adicionada ao meio reacional (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mL), com a espuma descrita em 5.5.	Variação da cor da espuma durante estocagem	4.2.1.7	5.4

Fonte: O Autor.

4.2.1 Síntese da Espuma de poliuretano funcionalizada

4.2.1.1 Avaliação da razão volumétrica entre polioliol, isocianato e glutaraldeído.

Para a produção de suportes que tenham características necessárias à imobilização enzimática, primeiramente deve-se selecionar a razão volumétrica entre os reagentes base do poliuretano: polioliol e isocianato. Como o glutaraldeído participará da reação de polimerização, sua razão volumétrica deverá ser avaliada em relação à qualidade visual da espuma produzida.

Foram produzidas espumas de PU com 5 razões volumétricas (grupos **a** – **e**) entre polioliol e isocianato, sempre totalizando um volume final de 10 mL. Avaliou-se o efeito do glutaraldeído no meio reacional, com a adição de 4 volumes distintos de solução de glutaraldeído 50% (m/v) (0,5 à 2,0 mL), totalizando 20 ensaios (Tabela 6).

Tabela 6: Razão volumétrica dos reagentes (polioliol: isocianato: glutaraldeído).

GRUPO	CÓDIGO	FORMULAÇÃO DA ESPUMA
a	a.1 a.2 a.3 a.4	a) Polioliol (7 mL) + Isocianato (3mL) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) Resultado visual: Figura 21
b	b.1 b.2 b.3 b.4	b) Polioliol (6 mL) + Isocianato (4mL) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) Resultado visual: Figura 22
c	c.1 c.2 c.3 c.4	c) Polioliol (5 mL) + Isocianato (5mL) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) Resultado visual: Figura 23
d	d.1 d.2 d.3 d.4	d) Polioliol (4 mL) + Isocianato (6mL) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) Resultado visual: Figura 24
e	e.1 e.2 e.3 e.4	e) Polioliol (3 mL) + Isocianato (7mL) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) Resultado visual: Figura 25

Nota: No campo código, para todas as formulações das espumas produzidas para imobilização, em que **1** = 0,5 mL; **2** = 1,0 mL; **3** = 1,5 mL e **4** = 2,0 mL de solução de glutaraldeído 50% (m/v).

V_1 = Volume adicionado da solução de glutaraldeído (0,5 – 2,0 mL) conforme código da espuma.

Fonte: O Autor.

O processo de síntese do PU funcionalizado consiste na mistura prévia dos volumes correspondes glutaraldeído ao polioliol da Tabela 6, em um copo polimérico de 200 mL,

mediante agitação manual com bastão e vidro até a obtenção de uma solução homogênea (aproximadamente 30 segundos).

Segue-se então com a adição do isocianato (Tabela 6), mantendo o sistema sob agitação manual até observar a formação das primeiras bolhas de gás (fase creme), método semelhante ao descrito no item 3.4.5, deixando descansar por 24 horas para ocorrer a cura do polímero. Após o endurecimento do material polimérico, o suporte é submetido a um fracionamento em dois blocos e analisado em relação aos aspectos visuais e mecânicos.

Os suportes produzidos conforme Tabela 6 foram observados de forma qualitativa e visual, algumas características da espuma como homogeneidade da estrutura polimérica formada, conformação, flexibilidade, maciez, firmeza e porosidade interna.

Para a espuma de PU que apresentou o melhor desempenho avaliou-se a capacidade de sorção de água e a presença de grupos aldeídos reativos, mediante teste de Schiff conforme descrito no item 4.1.2.4.

Considerando que outros fatores, como a incorporação de aditivos e temperatura podem afetar no processo de polimerização, na condição que apresentou o melhor desempenho foram propostas outras metodologias de produção do EPU (Tabela 7), com a finalidade de observar suas influências sobre a qualidade do suporte:

- i) Incorporação ao processo reacional a glicerina;
- ii) Acidificação do meio reacional;
- iii) Temperatura de polimerização (ambiente em torno de 25°C e controlada a 40°C).

4.2.1.2 Avaliação da adição de glicerina e acidificação meio reacional sobre a qualidade da espuma

Segundo a literatura, tanto a incorporação de agentes reticuladores, como a glicerina, quanto o pH do meio e a temperatura são variáveis que podem interferir na qualidade da espuma formada (IONESCU, 2005; VILAR, 2011) .

Neste contexto foram conduzidos novos ensaios, empregando os volumes de polioliol (7 mL) e isocianato (3 mL), conforme resultados descritos no item 5.1. Os ensaios estão descritos na Tabela 7: na presença de glicerina (**grupo b**), na ausência de glicerina (**grupo a**), com adição de ácido inorgânico (**grupo c/d**) ou sem adição de ácido inorgânico (**grupo b**), a temperatura da polimerização variando de ambiente (23-25°C) (**grupo c**) e a 40°C (**grupo d**), gerando 4 diferentes formulações. Para cada formulação, avaliou-se o efeito da adição de 4 volumes distintos de uma solução de glutaraldeído 50% (m/v) (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL), totalizando 16 ensaios (Tabela 7).

Tabela 7: Formulação de suportes (EPU) para imobilização de enzimas.

GRUPO	CÓDIGO	FORMULAÇÃO DA ESPUMA
a	a.1	a) Reagentes básicos do PU (Poliol e Isocianato) + Glutaraldeído Proporção dos reagentes: Poliol (7 mL) + Isocianato (3mL) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1)
	a.2	
	a.3	
	a.4	
b	b.1	b) Grupo a + Adição de Glicerina ao meio reacional Proporção dos reagentes: Poliol (7 mL) + Isocianato (3 mL+ V_1) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) + Glicerina (V_2)
	b.2	
	b.3	
	b.4	
c	c.1	c) Grupo b + Adição de Ácido à reação em temperatura ambiente (23-25°C) Proporção dos reagentes: Poliol (7 mL) + Isocianato (3 mL+ V_1) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) + Glicerina (V_2)
	c.2	
	c.3	
	c.4	
d	d.1	d) Grupo b + Adição de Ácido à reação em temperatura de 40°C Proporção dos reagentes: Poliol (7 mL) + Isocianato (3 mL+ V_1) + Glutaraldeído 50% (m/v) (V_1) + Glicerina (V_2)
	d.2	
	d.3	
	d.4	

Nota: No campo código, para todas as formulações das espumas produzidas para imobilização, em que **1** = 0,5 mL; **2** = 1,0 mL; **3** = 1,5 mL e **4** = 2,0 mL de solução de glutaraldeído 50% (m/v).

V_1 = Volume adicionado da solução de glutaraldeído (0,5 – 2,0 mL) conforme código da espuma.

V_2 = Volume glicerina é igual ao volume da solução de glutaraldeído 50% (m/v) (0,5 – 2,0 mL).

Fonte: O Autor.

O volume de glicerina empregado em cada ensaio foi equivalente ao volume de solução de glutaraldeído a 50% avaliado, conforme descrito na Tabela 7.

Previamente a síntese do PU são preparadas duas soluções-mãe de glutaraldeído e glicerina 1:1 (mL/mL) para as espumas produzidas (Tabela 7), as quais serão empregadas como precursoras de ambos os reagentes na síntese do PU funcionalizado:

- i) Sem adição de ácido inorgânico (**grupo b**);
- ii) Acidificação com ácido inorgânico (**grupos c e d**) com ácido fosfórico 3 mol.L⁻¹ na proporção de 1 mL (solução de H₃PO₄) : 10 mL (glutaraldeído e glicerina).

Outros ácidos inorgânicos poderiam ser utilizados neste processo, tais como o ácido clorídrico (HCl) e o ácido sulfúrico (H₂SO₄), a escolha do ácido fosfórico foi realizada pelo fato que este apresenta a menor constante de ionização em comparação aos outros ácidos inorgânicos, com constante de ionização de ácido (K_a) para HCl na ordem de 10⁷, para o

H_2SO_4 $K_{a1} = 2,4 \times 10^6$ e $K_{a2} = 1,0 \times 10^{-2}$ para as suas duas ionizações, e para o H_3PO_4 , com suas três ionizações $K_{a1} = 7,1 \times 10^{-3}$, $K_{a2} = 6,8 \times 10^{-8}$ e $K_{a3} = 4,6 \times 10^{-13}$ (RUSSELL, 1994). O objetivo deste procedimento era deixar o meio acidificado sem que ocorressem alterações nos reagentes devido ao maior poder de ionização dos outros ácidos inorgânicos citados.

Considerando que o glicerol é um poliol, a fim de manter o balanceamento reacional entre os poliois e o isocianato, fez-se necessário um acréscimo no volume de isocianato equivalente ao volume de glicerina adicionado, conforme observado na Tabela 7.

Por exemplo, para produção da espuma com código **(b.2)** da Tabela 7 foram empregados 7 mL de poliol, 4 (3 + 1) mL de isocianato + 2 mL da mistura de glutaraldeído e glicerina, a qual corresponde a 1 mL de glicerina e 1 mL de glutaraldeído 50% (m/v).

As espumas funcionalizadas com glutaraldeído foram produzidas com o auxílio de duas seringas descartáveis, uma micropipeta e um recipiente de polipropileno (200 mL) onde os reagentes foram misturados e homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro, conforme a seguinte sequência:

- i)** Misturou-se volumes iguais de glicerina e solução de glutaraldeído, reservando-se (grupo **b**) e quando aplicável acidificou-se com ácido fosfórico (grupos **c** e **d**);
- ii)** Adicionou-se ao recipiente de polipropileno 7 mL de poliol e o volume V_1 de solução de glutaraldeído (grupo **a**) ou mistura de glicerina e glutaraldeído (grupo **b**) ou mistura acidificada de glicerina e glutaraldeído (grupos **c** e **d**), conforme Tabela 7;
- iii)** Misturou-se até formação a de uma solução homogênea;
- iv)** Adicionou-se a solução o volume de isocianato correspondente a cada ensaio, ou seja, 3 mL + V_2 (volume de glicerina), e com o auxílio de bastão de vidro promoveu-se a mistura até o início da formação das primeiras bolhas de gás (CO_2), que é o início da fase creme da espuma;
- v)** Deixou-se descansar por 24 horas para que ocorra a estabilidade da espuma.

Foram acompanhadas algumas características visuais da espuma, como homogeneidade da estrutura polimérica formada, conformação, flexibilidade, maciez, firmeza e porosidade interna.

Também foram conduzidos ensaios de identificação de grupos aldeídos reativos presentes na estrutura do PU, mediante reação com reagente de Schiff (4.2.1.4), bem como ensaios de lixiviação do glutaraldeído excedente com água (4.2.1.5 e 4.2.1.6).

Paralelamente foram realizados periodicamente (entre 1 e 81 dias) ensaios colorimétricos das espumas (4.2.1.7), acompanhando as variáveis L^* , a e b .

4.2.1.3 Ensaios de lixiviação

Os ensaios de lixiviação foram conduzidos com 1 g EPU funcionalizada e 60 mL de água destilada. O sistema foi submetido a agitação mecânica por 15 minutos a temperatura ambiente (23-25°C). Após este período, a EPU foi removida do sistema e submetida a uma nova lavagem nas mesmas condições. Ambas as águas de lavagem foram analisadas quanto a presença de glutaraldeído de forma direta, mediante teste de Fehling (4.2.1.5), e de forma indireta mediante análise do carbono orgânico total (COT) conforme item 4.2.1.6.

4.2.1.4 Teste de Schiff

O teste de Schiff é um ensaio empregado para a identificação de grupos carbonila, seja em cetonas ou aldeídos, em diferentes amostras. O reagente de Schiff altera sua cor original de rosa pálido para violeta/porpura na presença de grupos aldeídos.

Para a identificação qualitativa de grupos carbonilas, vinculado a aldeídos, na EPU gotejou-se de 3 a 4 gotas do reativo de Schiff sobre uma porção da espuma, observando o surgimento da coloração violeta. Como referência empregou-se o teste realizado com uma espuma de PU isenta da adição de glutaraldeído.

4.2.1.5 Teste de Fehling

Para evidenciar a lixiviação de glutaraldeído da espuma, ou que o mesmo não estava quimicamente ligado ao EPU, foi empregado o teste de Fehling. No teste de Fehling o íon cúprico do reativo de Fehling ao oxidar o aldeído se reduz a íon cuproso, o qual em solução básica precipita na forma de óxido cúprico de coloração avermelhada (ALLINGER, 1980).

O reativo de Fehling é composto por duas soluções separadas, uma denominada A e outra B. A solução Fehling A corresponde a uma solução aquosa de sulfato de cobre (II), enquanto o Fehling B é uma solução aquosa incolor de tartarato de sódio e potássio (também conhecido como sal de Rochelle) e uma base forte (NaOH) (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2007).

As soluções para o teste de Fehling foram preparadas da seguinte forma:

- a) Fehling A = 6,927 g de sulfato de cobre II penta hidratado são diluídos em água destilada até completar 100 mL de solução.
- b) Fehling B = 36,2 g de tartarato de sódio e potássio e 10 g de hidróxido de sódio são diluídos em água destilada até completar 100 mL solução.

Para a preparação do reagente de Fehling volumes iguais das duas soluções (Fehling A

e B) são misturados. A solução resultante apresenta uma cor azul escura intensa e não deve ser armazenada por muito tempo.

Os ensaios foram conduzidos com 5 mL de cada água de lavagem com 6 mL da solução de Fehling (Fehling A e B em proporção 1:1, v/v). Os reagentes foram misturados e deixados sob aquecimento a 100°C por 10 minutos. Após decorrido o tempo estipulado, foi avaliado o aspecto visual de cada tubo de ensaio.

4.2.1.6 Determinação do Teor de Carbono Orgânico Total (COT)

O teor de carbono orgânico total foi empregado como resposta para avaliar a lixiviação de glutaraldeído do suporte após a etapa de síntese. Visando uma interpretação mais quantitativa, foi construído uma curva de calibração, relacionando concentração de glutaraldeído *versus* COT, a qual encontra-se apresentada, junto com sua equação da reta e de regressão dos dados a glutaraldeído, na Figura 20.

A Figura 20 representa a curva padrão de glutaraldeído em solução, simulando a lixiviação deste composto do suporte funcionalizado. Esta curva foi construída através de diluições seriadas partindo-se da solução de 50% (m/v) de glutaraldeído utilizado para a reação de produção da espuma de poliuretano. As medições de COT foram realizadas pelo determinador de Carbono Orgânico TOC-V CSH da marca Shimadzu®, relacionando o aumento de carbono orgânico em solução com a presença de glutaraldeído nesta solução ocasionado pela lixiviação do glutaraldeído do suporte, que resultaria em menor densidade de ativação do suporte e por consequência menor imobilização da enzima.

A quantidade de glutaraldeído lixiviada do suporte produzido neste trabalho pode ser descrita pela Equação 1.

$$P_{GLU} = 1.000 \left(\frac{(CO_L - CO_B) - 158,407}{2.114.151,587} \right) x V_L \left(\frac{M_E}{M_A} \right) \quad (1)$$

Sendo:

P_{GLU} = Glutaraldeído lixiviado da espuma após cada lavagem do suporte (mg);

CO_L = Carbono Orgânico Total (mg C / L) da espuma com glutaraldeído;

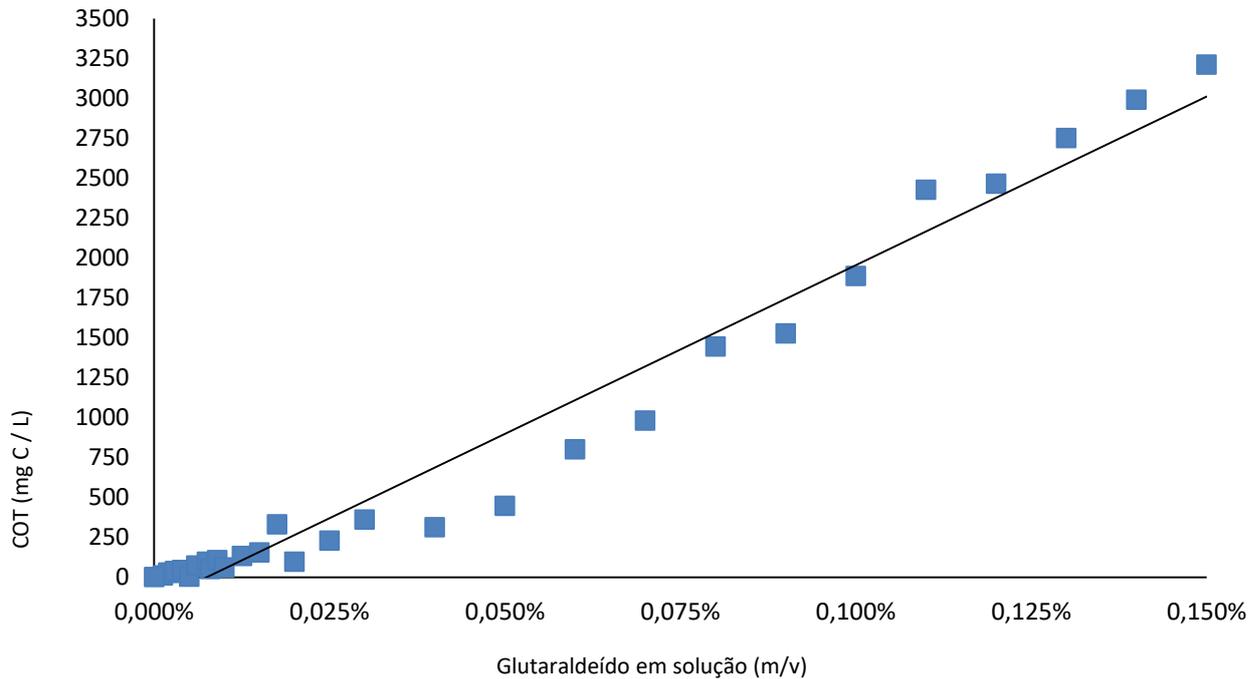
CO_B = Carbono Orgânico Total (mg C / L) da espuma sem glutaraldeído (Tabela 8);

V_L = Volume da água de lavagem (mL);

M_E = Massa de espuma total produzida com glutaraldeído no meio reacional (g);

M_A = Massa de espuma que sofreu o processo de lavagem (g).

Figura 20: Curva padrão de COT versus glutaraldeído em solução (m/v).



Fonte: O Autor.

Com as medições de perda de glutaraldeído por COT nas duas lavagens, tem-se a quantidade de glutaraldeído lixiviada para cada tipo de espuma e em função do volume adicionado de solução de glutaraldeído descrita pela Equação 2.

$$Rendimento = 100 \left(\frac{MI_{GLU} - P1_{GLU} - P2_{GLU}}{MI_{GLU}} \right) \quad (2)$$

Sendo:

Rendimento = Proporção de glutaraldeído inserida na cadeia polimérica (%);

P1_{GLU} = Glutaraldeído lixiviado da espuma na primeira lavagem (mg) – Equação 1;

P2_{GLU} = Glutaraldeído lixiviado da espuma na segunda lavagem (mg) – Equação 1;

MI_{GLU} = Massa introduzida de glutaraldeído no processo de polimerização (mg) em função do volume adicionado de glutaraldeído no meio reacional.

Como o glutaraldeído está presente em uma solução de 50% (m/v), a massa introduzida ao meio reacional está conforme o volume adicionado desta solução, variando de 0,5 até 2,0 mL de solução, portanto, a massa introduzida (MI_{GLU}) presente na Equação 2 está conforme relação abaixo:

- i)** 0,5 mL de glutaraldeído 50% equivale a 250 mg de glutaraldeído introduzido (MI_{GLU}) ao meio reacional, válido para as espumas **a.1; b.1; c.1; d.1**.
- ii)** 1,0 mL de glutaraldeído 50% equivale a 500 mg de glutaraldeído introduzido (MI_{GLU}) ao meio reacional, válido para as espumas **a.2; b.2; c.2; d.2**.
- iii)** 1,5 mL de glutaraldeído 50% equivale a 750 mg de glutaraldeído introduzido (MI_{GLU}) ao meio reacional, válido para as espumas **a.3; b.3; c.3; d.3**.
- iv)** 2,0 mL de glutaraldeído 50% equivale a 1000 mg de glutaraldeído introduzido (MI_{GLU}) ao meio reacional, válido para as espumas **a.4; b.4; c.4; d.4**.

Para determinação dos brancos da análise de COT foram produzidos 5 espumas “brancas” (sem a presença de glutaraldeído), descritos na Tabela 8.

- i)** Espumas com polioliol (7 mL) e isocianato (3 mL);
- ii)** Espumas com polioliol (7 mL), isocianato (3 mL) e glicerina (0,5 mL);
- iii)** Espumas com polioliol (7 mL), isocianato (3 mL) e glicerina (1,0 mL);
- iv)** Espumas com formulação polioliol (7 mL), isocianato (3 mL) e glicerina (1,5 mL);
- v)** Espumas com formulação polioliol (7 mL), isocianato (3 mL) e glicerina (2,0 mL).

As espumas descritas acima foram produzidas conforme item 4.2.1.2. Após a sua cura, foram lavadas na mesma proporção de que o suporte, ou seja, com a utilização de 60 mL de água para 0,1 de espuma sob agitação durante 15 minutos, separando-se a espuma do líquido e a quantificação de glutaraldeído sob a análise de COT, com resultados descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Valor de branco para COT das espumas utilizando a Equação 1.

TIPO	ESPUMAS (Tabela 7)	COT_B (mg C / L)
Polioliol (7 mL) + Isocianato (3 mL)	a.1; a.2; a.3; a.4	35,89
0,5 mL Glicerina + 0,5 mL Glutaraldeído	b.1; c.1; d.1	22,65
1,0 mL Glicerina + 1,0 mL Glutaraldeído	b.2; c.2; d.2	34,30
1,5 mL Glicerina + 1,5 mL Glutaraldeído	b.3; c.3; d.3	42,72
2,0 mL Glicerina + 2,0 mL Glutaraldeído	b.4; c.4; d.4	104,10

Fonte: O Autor.

4.2.1.7 Avaliação da cor da espuma por Colorímetro: influência do glutaraldeído

A avaliação da mudança de coloração da espuma durante o armazenamento será empregada para propor um mecanismo da ligação química do glutaraldeído na estrutura do EPU, visto que nem todo o glutaraldeído adicionado é lixiviado, evidenciando uma ligação mais forte (provavelmente química) do que ocorreria em uma atração física.

Este ensaio foi conduzido com 5 espumas com variação na quantidade de glutaraldeído incorporado ao meio reacional (4 com volumes de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mL de glutaraldeído 50% (m/v) e 1 sem glutaraldeído denominado de controle) conforme item c da Tabela 7, com a finalidade de avaliar a influência da quantidade de glutaraldeído na cor da espuma durante a estocagem e com estes resultados propor um mecanismo da incorporação.

Os parâmetros do colorímetro (L^* , a , b) foram avaliados periodicamente durante 81 dias. As espumas foram armazenadas em local seco e protegido da luz.

A medida da cor de cada espuma produzida foi realizada com o colorímetro (CHROMA METER CR-400), com fonte de luz D65, ângulo de observação de 10° e abertura de célula de 30 mm, utilizando-se coordenadas L^* , a , b do sistema CIELAB. O espaço CIELAB é composto por três eixos. O eixo vertical (L^*) que representa a luminosidade variando do nível zero (preto) ao 100 (branco). O eixo (a) varia de $+a$ (vermelho) até o $-a$ (verde) e o eixo (b) indo de $+b$ (amarelo) ao $-b$ (azul), com ambos os eixos apresentando valores entre -120 e +120.

Foram feitas 3 leituras de cada amostra, sendo o resultado de cada medida a média das 3 leituras, com os seus respectivos desvios-padrão para análises estatísticas.

Por meio das coordenadas L^* , a , b , foi calculada a diferença de coloração (ΔE) para cada amostra de espuma durante a estocagem em relação ao controle (espuma sem glutaraldeído no tempo inicial) através da Equação 3.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (3)$$

Sendo:

$$\Delta L = L^*_{\text{GLU}} - L^*_{\text{CONTROLE}}$$

$$\Delta a = a_{\text{GLU}} - a_{\text{CONTROLE}}$$

$$\Delta b = b_{\text{GLU}} - b_{\text{CONTROLE}}$$

4.2.2 Imobilização da Lipase

O processo de imobilização foi realizado empregando 60 mL da solução-mãe (com formulação descrita abaixo) para cada 1 g de EPU funcionalizada com glutaraldeído.

As soluções mães foram constituídas da seguinte maneira:

- ✓ 9 mL de extrato enzimático;
- ✓ 250 mL de água destilada;
- ✓ 50 mL da solução-tampão no pH desejado para a imobilização da lipase;
- ✓ Foram corrigidos o pH da solução-mãe para o valor determinado no planejamento experimental.

A relação solução-mãe e massa de suporte é mantida constante em todos os ensaios descritos para avaliação de rendimento de imobilização, atividade de suporte, otimização de parâmetros cinéticos.

Considerando que tanto a temperatura quanto o pH interferem na ligação química entre a enzima e o suporte, ambas as variáveis foram otimizadas mediante um planejamento experimental. Os níveis avaliados para cada variável encontram-se apresentados na Tabela 9. A escolha da faixa de pH considera os pontos isoelétricos dos aminoácidos (Tabela 17) presentes em enzimas, e a escolha da faixa de temperatura considera a faixa de utilização da lipase.

A espuma (suporte) é adicionada na solução-mãe no tempo zero da cinética de imobilização enzimática por ligação covalente, quando a solução-mãe está pronta e conforme parâmetros de pH e temperatura através do planejamento fatorial descrito na Tabela 9.

Tabela 9: Variáveis independentes e níveis empregados no planejamento fatorial 2².

Parâmetro	- 1	0	+ 1
pH Solução-mãe – (X ₁)	6,0	8,0	10,0
Temperatura (°C) – (X ₂)	20,0	40,0	60,0

Fonte: O Autor.

Considerando que o tempo é uma variável a ser considerada neste processo, inicialmente foi realizado um estudo cinético com a condição teoricamente mais desfavorável, ou seja, em pH 6 e a 20°C, pois a velocidade de imobilização por ligação covalente mais lenta em meios mais ácidos e temperaturas mais baixas. Houve o acompanhando a atividade do sobrenadante em 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 150 e 180 minutos reacionais.

Depois de definido o tempo reacional, foram realizados os ensaios de imobilização de acordo com as condições do planejamento. A etapa de imobilização foi conduzida em constante agitação em agitador orbital a 160 rpm.

Após o tempo definido, a suporte foi submetida a duas lavagens sucessivas com 50 mL de água, com a finalidade de extrair as enzimas imobilizadas por adsorção. Após a lavagem os imobilizados foram caracterizados em relação a atividade. A resposta avaliada foi a atividade do imobilizado gerado.

Para avaliar a contribuição do processo adsorptivo na imobilização, com a condição otimizada, a qual corresponde a condição cujo imobilizado apresentou maior atividade catalítica, foi conduzido um ensaio em paralelo, nas mesmas condições de pH, temperatura e tempo de contato, empregando como suporte uma espuma de poliuretano sintetizada sem a adição de glutaraldeído (branco), esta não apresenta a capacidade de imobilização por ligação covalente. Após a etapa de adsorção, a espuma foi removida do meio reacional, submetida a lavagem com água destilada, seca e submetida a medida de atividade.

Neste trabalho empregou-se um planejamento fatorial 2^2 completo, com repetição em triplicata no ponto central. Os fatores avaliados (variáveis independentes) foram pH da solução-mãe para o processo de imobilização enzimática por ligação covalente (X_1) e temperatura (X_2) de imobilização por ligação covalente. Na Tabela 9 estão apresentadas as variáveis (fatores) exploradas neste trabalho com seus respectivos níveis, totalizando 7 ensaios. A resposta avaliada (variável dependente) foi a atividade do imobilizado (espuma-lipase) (U/g), denominada de Y. O seguinte modelo linear foi utilizado para a análise estatística conforme 4.2.3:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2$$

Onde:

Y = Resposta (U/g);

X₁ = pH (fator) da solução-mãe do processo de imobilização por ligação covalente;

X₂ = temperatura (fator) em que ocorreu a imobilização por ligação covalente (°C);

b₀, b₁ e b₂ são os coeficientes de regressão do modelo.

4.2.2.1 Determinação da atividade enzimática da Lipase

A atividade de esterificação das lipases livre e imobilizadas nos casos descritos acima foi quantificada empregando a metodologia descrita Duarte *et al.*, (2016), a qual foi adaptada de Ferraz *et al.*, (2012).

Os ensaios foram conduzidos empregando 0,1 g de catalisador imobilizado e 5 mL de substrato (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1). A reação foi conduzida a 40°C, por 40 min em agitação mecânica de 160 rpm. Após este período reacional, alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional e adicionadas a alíquotas de 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v), sendo posteriormente titulada com NaOH 0,05 M até pH 11.

As análises foram realizadas em triplicata, onde uma unidade de atividade enzimática de esterificação foi definida como a quantidade de ácido graxo (oleico) (µmol) consumida por grama de imobilizado por minuto, nas condições do ensaio, sendo calculada empregando a Equação 4.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_F}{t \times M_{EL} \times V_C} \quad (4)$$

Sendo:

AE = Atividade de esterificação do suporte (U/g);

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

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

M = Molaridade da solução de NaOH;

V_F = Volume final de meio reacional (mL);

t = Tempo da reação (min);

M_{EL} = Massa do suporte com enzima imobilizada(g);

V_C = Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

4.2.3 Análise Estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Os resultados das variáveis dependentes também foram tratados por análise de regressão múltipla da metodologia de superfície de resposta. A ANOVA foi aplicada para testar a adequação dos modelos lineares e a significância da regressão foi observada pelo coeficiente de determinação. Além disso, para se visualizar o efeito das variáveis independentes nas respostas avaliadas foram construídos gráficos de superfície de resposta.

Toda análise estatística foi feita com o auxílio do programa computacional STATISTICA 5.0 (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa.

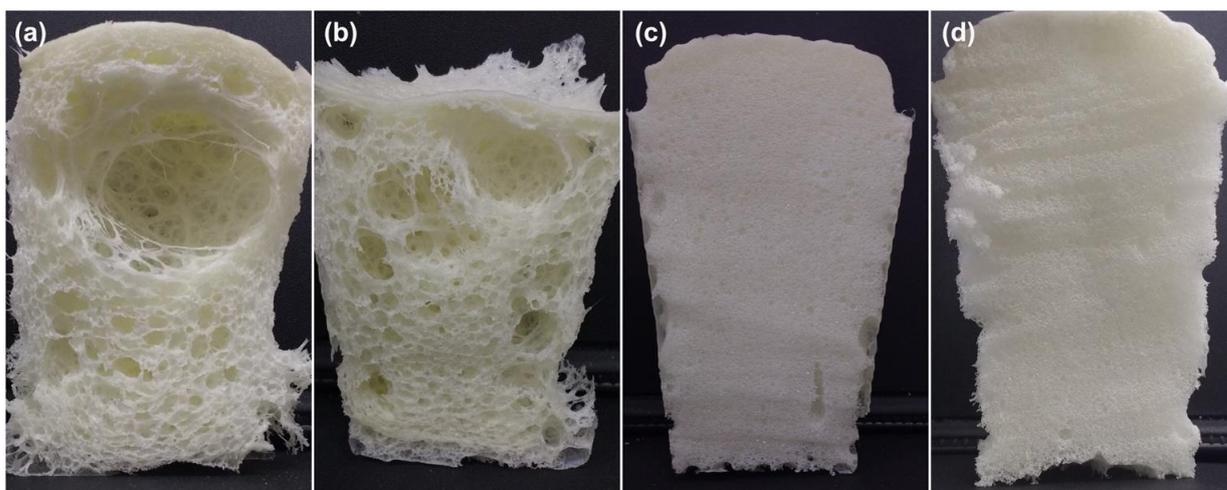
5.1 SÍNTESE DO POLIURETANO (PU): avaliação das proporções volumétricas polioliol:isocianato:glutaraldeído

Para a síntese do PU foram avaliadas diferentes proporções volumétricas dos monômeros polioliol e isocianato. Como parâmetro de avaliação acompanhou-se visualmente a consistência, a estabilidade quanto ao efeito de retração do volume, defeitos de conformação, a maleabilidade, a conformação dos poros da espuma, assim como a sua uniformidade.

As Figuras 21 à 25 apresentam o aspecto conformacional das espumas de PU sintetizadas empregando as diferentes proporções volumétricas de polioliol, isocianato e glutaraldeído, totalizando 20 suportes (espumas de EPU) descritas na Tabela 6.

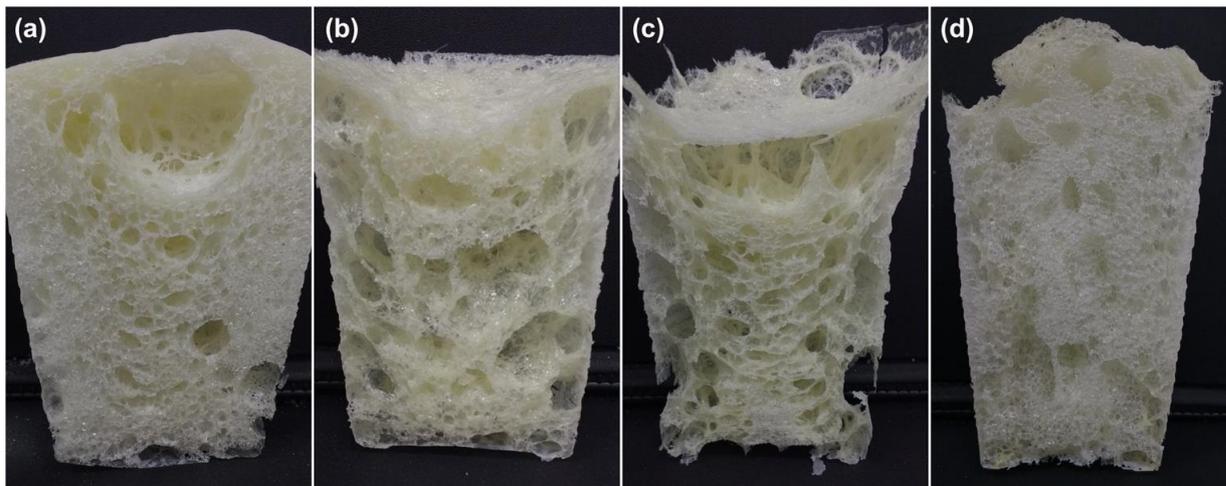
Percebe-se que com o aumento do teor de isocianato nas espumas produzidas (Figuras 21 à 25), a cor amarela da espuma fica mais evidente, devido a cor característica do reagente incorporado (Figura 19 (b)), assim como das reações com o isocianato descritas na revisão bibliográfica (3.4.4).

Figura 21: Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioliol:isocianato de 7:3 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) **(a)** 0,5 mL, **(b)** 1,0 mL, **(c)** 1,5 mL e **(d)** 2,0 mL.



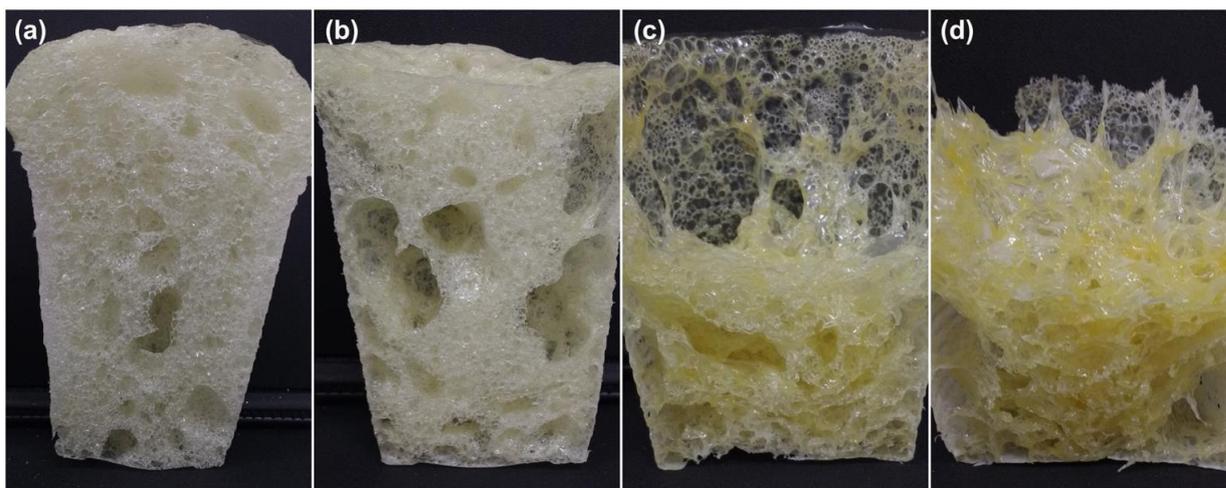
Fonte: O Autor.

Figura 22: Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioli:isocianato de 6:4 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL.



Fonte: O Autor.

Figura 23: Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioli:isocianato de 5:5 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL.



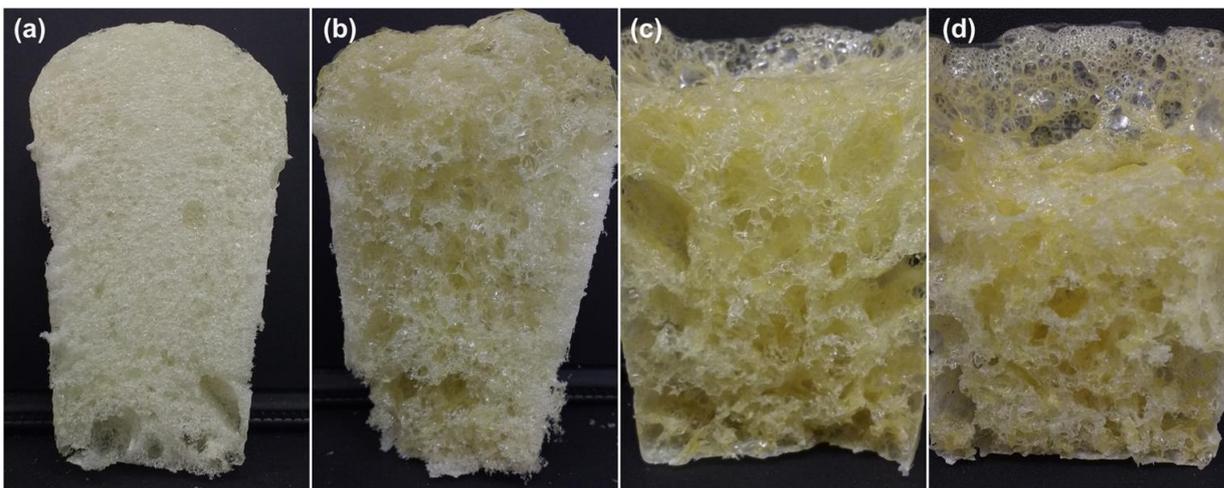
Fonte: O Autor.

Percebe-se tanto na Figura 22 quanto na Figura 23 um colapso na estrutura do suporte e uma não uniformidade nos poros da EPU, indicando que não há uma reação balanceada entre os principais agentes formadores de EPU (polioli, isocianato e água para expansão). Estas características não são as indicadas para um suporte de imobilização enzimática descritos no item 3.3.

Na Figura 23, observa-se um aumento na tonalidade alaranjada do suporte em função do aumento de glutaraldeído no meio reacional, que pode ser um indicador de que ocorre uma ligação química entre o glutaraldeído e a espuma de poliuretano, sendo este fato melhor

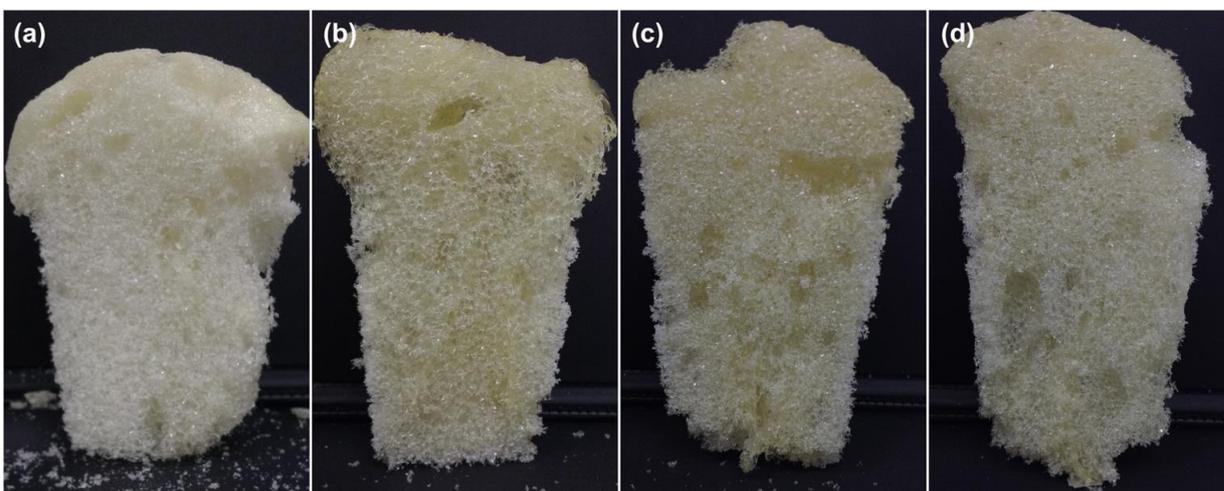
descrito no item 5.4, cuja a influência da adição de glutaraldeído na reação de produção de suporte foi melhor discutida.

Figura 24: Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioliol:isocianato de 4:6 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL.



Fonte: O Autor.

Figura 25: Aspecto conformacional das EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica (mL) de polioliol:isocianato de 3:7 acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL.



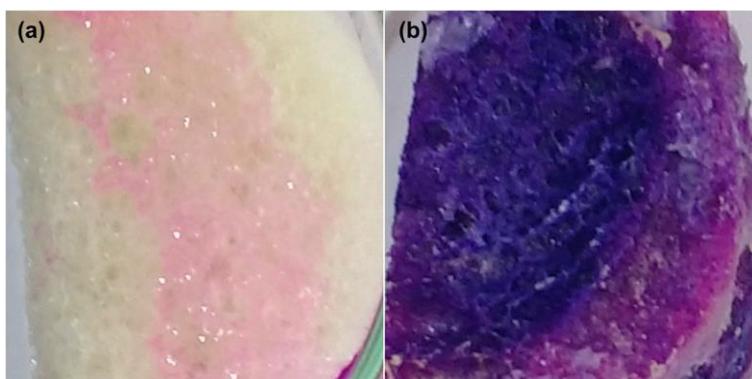
Fonte: O Autor.

Além disto, o aumento da proporção de isocianato conduz a geração de uma estrutura mais rígida, sendo que para a condição de 3 mL de polioliol e 7 mL de isocianato (Figura 25), houve a produção de espumas quebradiças, ou seja, com baixa estabilidade mecânica, característica esta indesejável em suportes enzimáticos. Esta tendência está coerente com a literatura, a qual relaciona este acréscimo da dureza da estrutura ao aumento das forças

intermoleculares. Em geral, poliuretanos com alto teor de isocianato tornam-se mais rígidos, devido ao aumento das ligações cruzadas pelas reações secundárias que produzem alofanato e biureto, proporcionando uma maior aderência e compactação dos poros (VILAR, 1990; IONESCU, 2005).

Em relação a incorporação do glutaraldeído, observam-se efeitos distintos de sua concentração em função da razão volumétrica polioliol:isocianato. Para as razões volumétricas aonde o polioliol esta em maior proporção (Figura 21), o aumento do teor de glutaraldeído conduz a formação de espumas menos expandidas, porém com melhor uniformidade dos poros e menos rígidas. Com o aumento da quantidade de isocianato, principalmente nas razões 5:5 e 4:6, observa-se um feito negativo, em termos conformacionais e estruturais, para o glutaraldeído, com as quantidades de 1,5 e 2,0 mL de solução de glutaraldeído 50% (m/v) conduzindo ao colapso estrutural das espumas produzidas (Figuras 23 e 24), o que pode indicar uma reação não balanceada em relação aos reagentes formadores do suporte (polioliol, isocianato e água).

Figura 26: Teste de Schiff para espumas respectivamente, (a) sem glutaraldeído, (b) com glutaraldeído.



Fonte: O Autor.

Em termos de composição funcional, foi conduzido o teste de Schiff, o qual é específico para grupos carbonilas. Neste teste, o reagente de Schiff na presença de grupos carbonila, conduz a formação de um composto de coloração purpura característico. Para todas as amostras testadas, com exceção do branco que foi conduzido sem a presença de glutaraldeído, o Teste de Schiff (Figura 26) deu positivo para a presença do grupo carbonila, indicando que o glutaraldeído encontra-se incorporado na estrutura da espuma.

Uma forma de melhorar as propriedades estruturais e mecânicas do PU é através da adição de aditivos funcionalizados e acidificação do meio.

Neste contexto foram conduzidos novos ensaios, nos quais avaliou-se os efeitos da

incorporação de glicerina e ácido fosfórico ao meio reacional referente a síntese do poliuretano.

Com base na avaliação visual das espumas obtidas a proporção volumétrica polioli:isocianato de 7:3 foi definida para a continuidade dos estudos (Figura 21), com a maioria das espumas com problemas de uniformidade de tamanho de poros ou até mesmo com estrutura colapsada, inviabilizando a sua utilização como suporte de imobilização enzimática.

A fim de melhorar a uniformidade de poros do suporte fabricado, houve a adição de glicerina no meio reacional, visto que este composto apresenta funcionalidade igual a 3, que propicia efeitos de reticulação na produção do poliuretano via reação com o isocianato, sendo este aspecto muito importante para que o suporte possa realizar o processo de imobilização por ligação covalente.

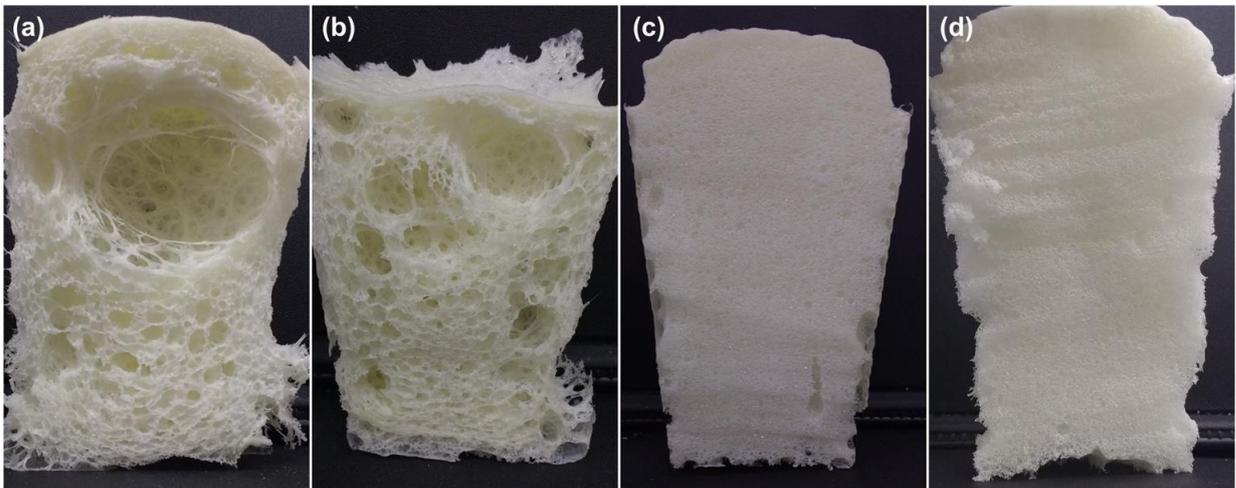
Para melhorar o balanço da reação, o volume adicionado de glicerina será compensado pelo mesmo aumento de volume de isocianato, conforme descrito na Tabela 7, a fim de que o suporte apresente melhor aspecto visual em relação às espumas sem a adição de glicerina. Além do efeito da glicerina no meio reacional, será avaliado o efeito da acidificação do meio reacional com a utilização de ácido fosfórico e a temperatura da reação, que é ambiente (em torno de 25°C) e a temperatura controlada do meio reacional (40°C), com todas as formulações descritas na Tabela 7. A seguir serão apresentados os resultados da variação da formulação das espumas conforme Tabela 7, sendo 4 formulações distintas e em cada formulação com a adição de 4 diferentes volumes de solução de glutaraldeído, totalizando 16 espumas produzidas para esta avaliação.

Os resultados visuais estão apresentados em 5.2, em que a uniformidade de poros, colapso de estrutura foram observados para estas 4 formulações distintas, com todas as espumas tendo a participação do glutaraldeído no meio reacional.

5.2 SÍNTESE DO POLIURETANO (PU): efeito da adição de glicerina, ácido fosfórico e temperatura.

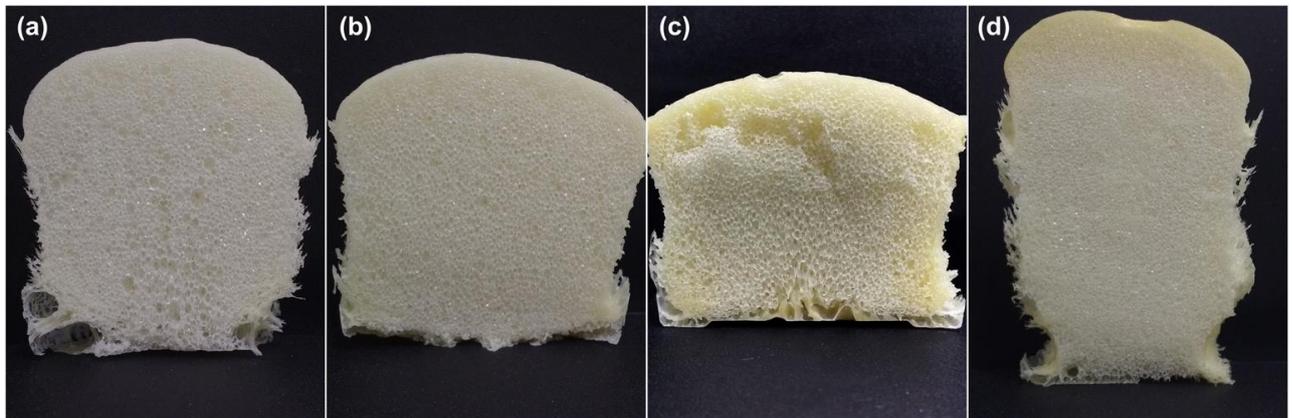
Os efeitos da incorporação de glicerina e ácido fosfórico, bem como da temperatura, sobre as propriedades estruturais dos poliuretanos foram avaliados empregando com base a razão volumétrica polioliol:isocianato de 7:3. As condições avaliadas encontram-se descritas na Tabela 7, e as espumas obtidas para cada condição encontram-se apresentadas nas Figuras 27 à 30.

Figura 27: EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioliol:isocianato de 7:3 (Grupo a – Tabela 7) acrescido de diferentes volumes de glutaraldeído 50% (m/v) (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL.



Fonte: O Autor.

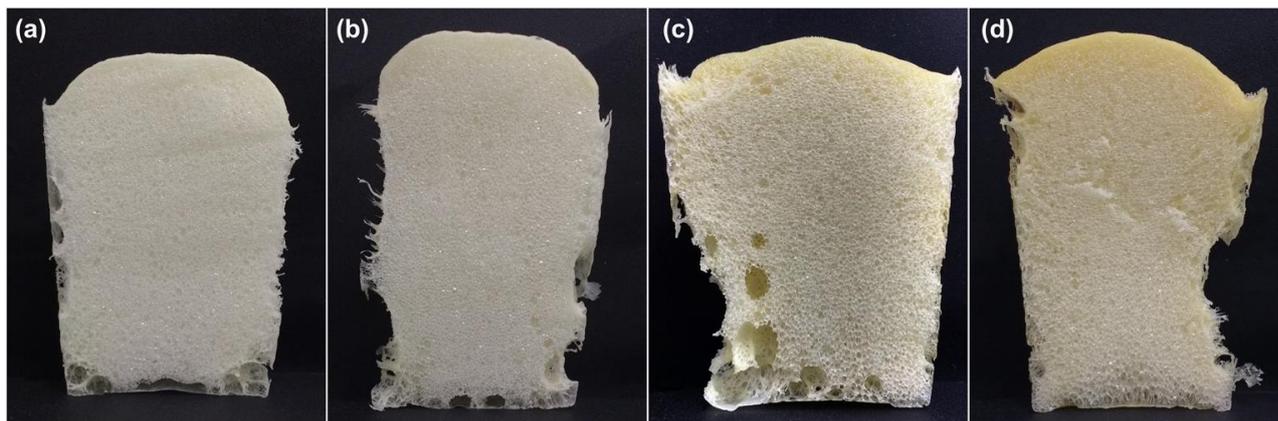
Figura 28: EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioliol:isocianato de 7:3 (Grupo b – Tabela 7) acrescido de glicerina e glutaraldeído 50% (m/v) em volumes iguais (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL.



Fonte: O Autor.

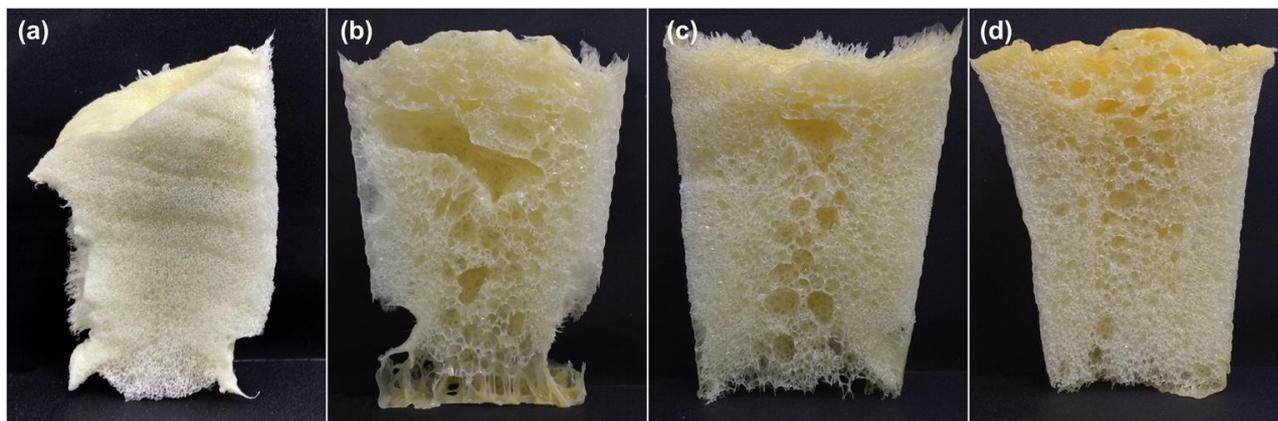
Quando comparamos as espumas obtidas sem e com glicerina (Figuras 27 e 28, respectivamente) observamos um efeito positivo da glicerina em relação a uniformidade do tamanho de poros, principalmente para as espumas sintetizadas empregando os menores volumes (0,5 e 1,0 mL) de glutaraldeído.

Figura 29: EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioli:isocianato de 7:3 (Grupo c – Tabela 7) acrescido de glicerina e glutaraldeído 50% (m/v) em volumes iguais, acidificado, (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL. Temp. (23 - 25°C).



Fonte: O Autor.

Figura 30: EPU's sintetizadas empregando uma razão volumétrica polioli:isocianato de 7:3 (Grupo d – Tabela 7) acrescido de glicerina e glutaraldeído em volumes iguais, acidificado, (a) 0,5 mL, (b) 1,0 mL, (c) 1,5 mL e (d) 2,0 mL. Temp. de 40°C.



Fonte: O Autor.

Outra característica observada, mas que não se demonstra nítida entre as Figuras, foi a compactação das espumas, com as EPU geradas na presença de glicerina apresentando uma altura aproximadamente 50% inferior a observada para as EPU's sintetizadas na ausência de glicerina, indicando uma contração na expansão das mesmas, a qual veio acompanhado de uma melhor distribuição dos poros e maleabilidade.

Ambos os efeitos, muito provavelmente estão vinculados ao efeito de reticulação que

Mestrado Tiago dos Santos Gonçalves

a glicerina, por ser um monômero com maior funcionalidade (no caso 3 hidroxilas) que o poliol (no caso 2) proporciona na reação de polimerização, melhorando as propriedades mecânicas e a distribuição uniforme das células da espuma produzida (MICHAELI *et al.*, 1995; MANO; MENDES, 1999).

A fim de investigar possíveis melhoras na produção de EPU's em relação a distribuição uniforme de tamanho de poros, pode-se utilizar a lecitina de soja no meio reacional, visto que a mesma apresenta poder emulsificante (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), pelo fato de que o isocianato, poliol e água formam uma emulsão, e a estabilidade desta pode ser um fator importante para a formação de uma espuma com boa uniformidade de tamanho de poros.

Em relação a pH do meio, a adição do ácido fosfórico ao meio glicerinado que foi conduzida a síntese de espumas (Figuras 29 e 30) mais expandidas (maiores) em relação as sintetizadas sem a presença do mesmo (Figura 28), porém mantendo as mesmas características visuais em termos de distribuição e uniformização dos poros e, maleabilidade. Este fato pode ser explicado pela velocidade de reação entre os reagentes principais do suporte (isocianato, poliol e água) ser catalisada pelo íons H^+ gerados no meio pela adição de H_3PO_4 .

Para a temperatura, visualmente observa-se um efeito negativo da mesma, com algumas EPU's sintetizadas a $40^\circ C$ (Figura 30) apresentando regiões com diferentes tamanhos de poros, algumas simulando uma região colapsada, o que ser justificado pela rápida expansão do CO_2 formado na reação sem o tempo necessário para a criação da célula, criando regiões com grandes poros e diminuindo a área de contato do suporte com o meio, piorando um parâmetro importante para a produção de um suporte conforme revisão bibliográfica (3.3).

As EPU's sintetizadas em meio ácido, seja a temperatura ambiente ou a $40^\circ C$ (grupos **c** e **d** – Tabela 7), caracterizam-se pelo realce da coloração alaranjada, principalmente para os maiores volumes de glutaraldeído, sugerindo que ocorre uma reação química entre o glutaraldeído e o suporte, com maior detalhamento no item 5.4 em que se observa os efeitos da adição do glutaraldeído na coloração da espuma.

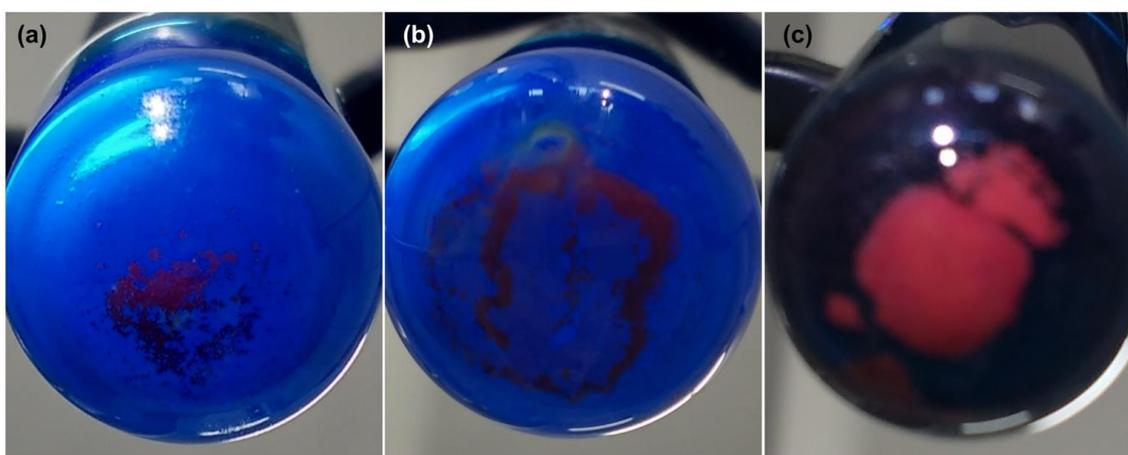
Após a síntese as espumas foram caracterizadas quanto a presença de grupos carbonila pelo teste de Schiff, onde todas deram resultado positivo (Figura 26), o que está coerente com as condições de síntese, uma vez que em todos os ensaios o glutaraldeído se fez presente.

5.3 ENSAIOS DE LIXIVIAÇÃO

Para verificar se o glutaraldeído ficou ancorado quimicamente ou não foram conduzidos ensaios de lixiviação, lavando a espuma com água destilada. Lavou-se os suportes por duas vezes cada com 60 mL água destilada para 1 g de EPU conforme descrito em 4.2.1.3, as quais foram caracterizadas frente ao reativo de Fehling, empregado para a identificação de grupos aldeídos, e quanto ao teor de Carbono orgânico total (COT).

Em relação ao teste de Fehling, como o mesmo conduz a formação de um precipitado de óxido cuproso (Cu_2O), o qual foram empregados como critério qualitativo da lixiviação de glutaraldeído, sua quantidade gerada foi empregada como critério semi-quantitativo para estipular a lixiviação de glutaraldeído do suporte. Para tanto estipulou-se um padrão empírico, cuja resposta pode ser pouco, médio ou muito precipitado, como ilustrado na Figura 31, assim como a coloração da solução de Fehling em função da reação de oxirredução no processo de análise que alteram a cor começando de azul e terminando em verde, como ilustrado na Figura 32.

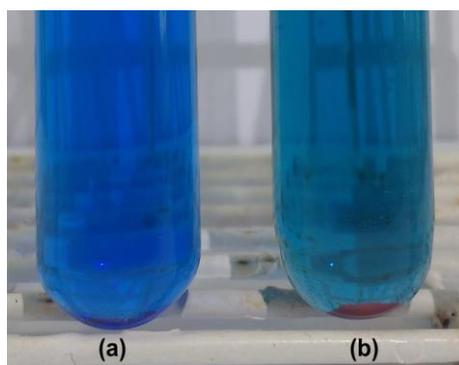
Figura 31: Padrão visual empírico para identificação semi-quantitativa de glutaraldeído lixiviado mediante Teste de Fehling: (a) pouco precipitado, (b) médio precipitado e (c) muito precipitado.



Fonte: O Autor.

Os resultados referentes aos testes qualitativos e semi-quantitativos frente ao reagente de Fehling, bem como os valores de COT, obtidos para as duas águas de lavagens encontram-se apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Figura 32: Padrão visual para o Teste de Fehling – cor da água de lavagem de suporte, respectivamente (a) azul e (b) verde.



Fonte: O Autor.

Para o teste qualitativo, o único que apresentou resposta negativa nas águas de lavagem, indicando que não houve lixiviação de glutaraldeído da espuma foi o primeiro ensaio, conduzido somente com polioli e isocianato, empregando a menor quantidade de glutaraldeído, ou seja, 0,5 mL da solução a 50%.

Esta tendência foi vinculada a baixa quantidade de glutaraldeído empregada no ensaio e a ausência de glicerina, a qual por ser um polioli com 3 grupos reativos (OH), quando presente (nos demais ensaios) compete com o glutaraldeído pelos sítios reativos do isocianato, minimizando seu ancoramento ao suporte.

Em relação a quantidade de precipitado formado observa-se visualmente para todas as condições avaliadas um aumento gradual da quantidade de precipitado formado em função do volume de glutaraldeído adicionado ao meio reacional, com a maior quantidade observada para 2,0 mL de glutaraldeído. Esta tendência indica que a quantidade de glutaraldeído lixiviado do suporte aumenta proporcionalmente com o aumento do volume de glutaraldeído adicionado nos ensaios de síntese.

Esta tendência era esperada, uma vez que o aumento da quantidade de glutaraldeído oferecida se deu empregando os mesmos volumes base para a síntese do poliuretano. Além disso, paralelamente a quantidade de glutaraldeído foi acrescentada a glicerina, a qual demonstrou pelos resultados iniciais, com 0,5 mL de glutaraldeído, das duas primeiras formulações (Grupos a e b – Tabela 7), que a mesma apresenta um efeito positivo para a lixiviação de glutaraldeído do suporte, ou seja, que de certa forma a glicerina atua juntamente com o suporte, minimizando a lixiviação do glutaraldeído. Em relação aos resultados de carbono orgânico total (COT) presente nas águas de lavagem, sua vinculação a quantidade de glutaraldeído lixiviado do suporte foi obtida mediante uma curva de calibração construída relacionando concentração de glutaraldeído versus COT (Figura 20).

Tabela 10: Identificação de glutaraldeído lixiviado empregando o Teste de Fehling.

Formulação da espuma – Tabela 7 (Grupos a, b, c, d)		Código da Espuma	Teste Qualitativo Precipitado – Figura 31	
			1ª LAVAGEM	2ª LAVAGEM
a	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL)	a.1	-	-
		a.2	++	++
		a.3	+++	+++
		a.4	+++	+++
b	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL+ V ₁) Glicerina (V ₂)	b.1	+	+
		b.2	++	++
		b.3	++	++
		b.4	+++	+++
c	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL+ V ₁) Glicerina (V ₂) Meio acidificado (23 – 25°C)	c.1	++	++
		c.2	++	++
		c.3	+++	+++
		c.4	+++	+++
d	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL+ V ₁) Glicerina (V ₂) Meio acidificado (40°C)	d.1	++	++
		d.2	++	++
		d.3	+++	+++
		d.4	+++	+++
Nota: No campo código, para todas as formulações das espumas produzidas para imobilização, em que 1 = 0,5 mL; 2 = 1,0 mL; 3 = 1,5 mL e 4 = 2,0 mL de solução de glutaraldeído 50% (m/v).				
V ₁ = Volume adicionado da solução de glutaraldeído (0,5 – 2,0 mL) conforme código da espuma.				
V ₂ = Volume glicerina é igual ao volume da solução de glutaraldeído 50% (m/v) (0,5 – 2,0 mL).				
No campo Formação de Precipitado – Figura 31: - corresponde à resposta Negativa ou não visualização de precipitado + corresponde a Pouco Precipitado – Figura 31 (a). ++ corresponde a Médio Precipitado – Figura 31 (b). +++ corresponde a Muito Precipitado – Figura 31 (c).				

Fonte: O Autor.

Há no processo de síntese outros compostos além do glutaraldeído, como glicerina e o próprio polioliol, que podem lixiviar da estrutura da espuma durante a etapa de lavagem, para cada condição avaliada foi sintetizada uma espuma em paralelo sem a presença de glutaraldeído, a qual foi denominada de branco (Tabela 8). Com os valores de COT's obtidos para estas amostras, e descontados dos valores obtidos para as águas de lavagens das espumas sintetizadas com glutaraldeído, antes de fazer a transformação de COT para glutaraldeído através da Equação conforme método descrito e 4.2.1.6. Com base na massa de glutaraldeído oferecida na síntese em função do volume adicionado e com a quantidade lixiviada estimada, foi possível estipular a quantidade incorporada no suporte (Tabela 11).

Tabela 11: Valores de glutaraldeído lixiviado empregando com resposta os valores de COT, bem como o rendimento de incorporação.

Formulação da espuma – Tabela 7 (Grupos a, b, c, d)		Glutaraldeído Disponível para Suporte (mg)	Glutaraldeído Lixiviado (mg) – Equação 1		Glutaraldeído Incorporado	
			1ª LAVAGEM	2ª LAVAGEM	(mg)	(%)
a	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL)	a.1 – 250	41,5	–	208,5	83,4 %
		a.2 – 500	114,9	–	385,1	77,0 %
		a.3 – 750	334,2	3,4	412,4	55,0 %
		a.4 – 1000	430,1	8,2	561,7	56,2 %
b	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL+ V ₁) Glicerina (V ₂)	b.1 – 250	22,8	–	227,2	90,9 %
		b.2 – 500	29,5	–	470,5	94,1 %
		b.3 – 750	52,7	–	697,3	93,0 %
		b.4 – 1000	190,9	–	809,1	80,9 %
c	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL+ V ₁) Glicerina (V ₂) Meio acidificado (23 – 25°C)	c.1 – 250	63,6	–	186,4	74,6 %
		c.2 – 500	169,4	–	330,6	66,1 %
		c.3 – 750	315,1	–	434,9	58,0 %
		c.4 – 1000	429,5	–	570,5	57,1 %
d	Poliol (7 mL) Isocianato (3 mL+ V ₁) Glicerina (V ₂) Meio acidificado (40°C)	d.1 – 250	66,8	–	183,2	73,3 %
		d.2 – 500	17,6	–	482,4	96,5 %
		d.3 – 750	317,3	–	432,4	57,7 %
		d.4 – 1000	493,7	–	506,3	50,6 %

Nota: No campo código, para todas as formulações das espumas produzidas para imobilização, em que **1** = 0,5 mL; **2** = 1,0 mL; **3** = 1,5 mL e **4** = 2,0 mL de solução de glutaraldeído 50% (m/v), equivalente as massas iniciais de 250 mg, 500 mg, 750 mg e 1.000 mg respectivamente.

V₁ = Volume adicionado da solução de glutaraldeído (0,5 – 2,0 mL) conforme código da espuma.

V₂ = Volume glicerina é igual ao volume da solução de glutaraldeído 50% (m/v) (0,5 – 2,0 mL).

– Resultados de COT inferiores aos brancos descritos na Tabela 8 do item 4.2.1.6.

Fonte: O Autor.

Todas as formulações de suporte (Tabela 11) avaliadas apresentaram uma mesma tendência, aumentando a quantidade de glutaraldeído lixiviado em função do volume oferecido na etapa de síntese, o que está coerente com a tendência apresentada para os resultados semi-quantitativos no teste de Fehling.

Em relação a quantidade de glutaraldeído incorporada, observa-se para todas as condições base avaliadas uma relação entre a quantidade de glutaraldeído incorporado com o aumento da quantidade oferecida na etapa de síntese, mesmo ocorrendo uma maior lixiviação.

Entre as condições testadas conforme Tabela 11, a conduzida somente com glicerina (Tabela 11 – grupo **b**) foi a que apresentou as maiores quantidades de glutaraldeído incorporado. Esta tendência pode estar relacionada a melhor compactação da espuma (Figura 28), minimizando perdas por lixiviação, uma vez que para esta condição o tamanho da espuma gerado foi aproximadamente 50% inferior as demais condições base testadas.

As espumas sintetizadas na presença de ácido (Tabela 11 – grupos **c** e **d**), apresentaram resultados de incorporação de glutaraldeído no suporte similares entre si, os quais são intermediárias as outras duas condições testadas (Tabela 11 – grupos **a** e **b**). A presença do ácido sugere uma diminuição parcial da quantidade de glutaraldeído incorporado em relação a base glicerinada sem ácido (Tabela 11 – grupo **b**), porém superior a sem glicerina (Tabela 11 – grupo **a**).

Em termos a incorporação do glutaraldeído ao suporte, diferentes rotas reacionais são possíveis. Para uma melhor compreensão devemos entender como o glutaraldeído se comporta quimicamente.

O glutaraldeído precisa de nucleófilos para reações de adição nucleofílica no carbono da carbonila assim como o isocianato, portanto podemos concluir que aldeídos não reagem com isocianatos por apresentarem a mesma característica de carga negativa em reações. Ele pode reagir com álcool (com possível formação de hemiacetal) e com a amina secundária que está presente no grupo uretano da formação do PU. Os compostos carbonilados que contêm ao menos um hidrogênio α reagem com aminas secundárias com perda de água para formar compostos conhecidos como enaminas, os quais contêm um nitrogênio básico diretamente ligado a um carbono olefínico ($R_1NCR=CR_2$). Ambas as reações são catalisadas em meio ácido, e neste trabalho foi escolhido o ácido fosfórico para a reação, porém poderia ter escolhido outro ácido inorgânico, como o HCl ou H₂SO₄ (ALLINGER, 1980; MORRISON; BOYD, 2011; VOLLHARDT; SCHORE, 2014).

A coloração amarelada/laranja das espumas sintetizadas, as quais apresentam uma tendência de aumento da intensidade desta coloração como aumento da quantidade da glutaraldeído (Figura 33) sugerem que o glutaraldeído encontra-se quimicamente ligado à

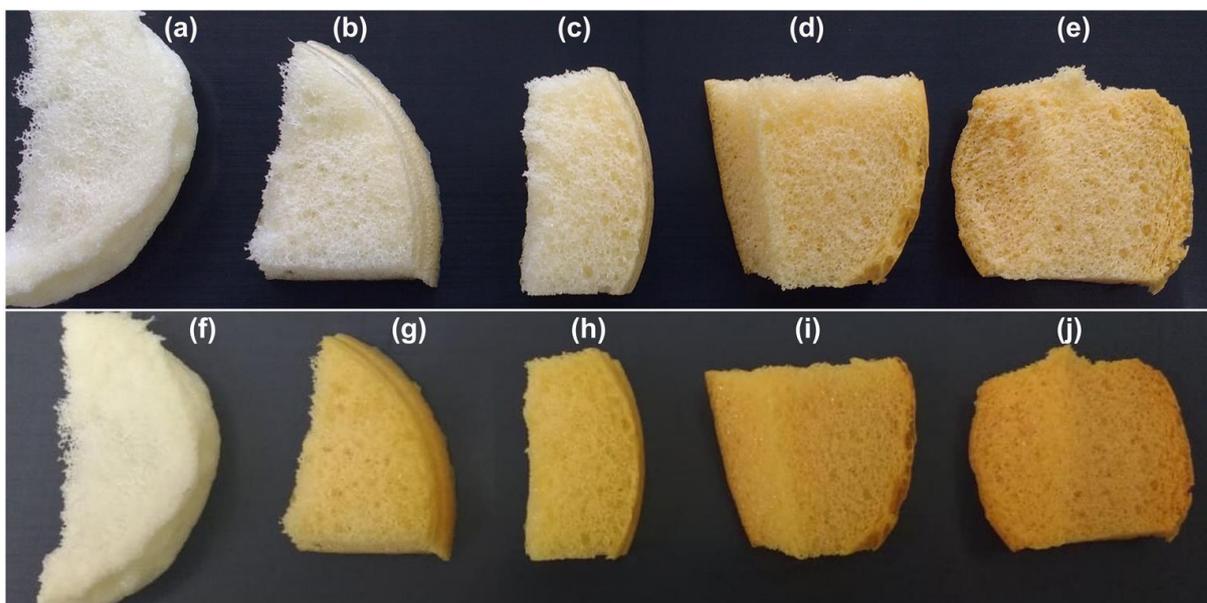
estrutura da espuma, e que esta interação ocorre pela reação entre o nitrogênio do grupo uretano e a carbonila do glutaraldeído em um mecanismo análogo ao da Reação de Maillard, empregado para explicar o escurecimento dos alimentos, cuja cor varia em função do tempo.

Neste sentido acompanhou-se a evolução da cor das espumas sintetizadas com diferentes volumes de glutaraldeído por um período de 81 dias. Escolheu-se como formulação para produção da espuma glicerinada em meio ácido a temperatura ambiente (Tabela 11 – grupo **c**), por ter apresentado além da cor mais acentuada logo após a síntese, uma boa incorporação e estrutura conformacional homogênea, em relação a sintetizada a 40°C (Tabela 11 – grupo **d**).

5.4 ENSAIOS NO COLORÍMETRO: efeito do glutaraldeído no suporte

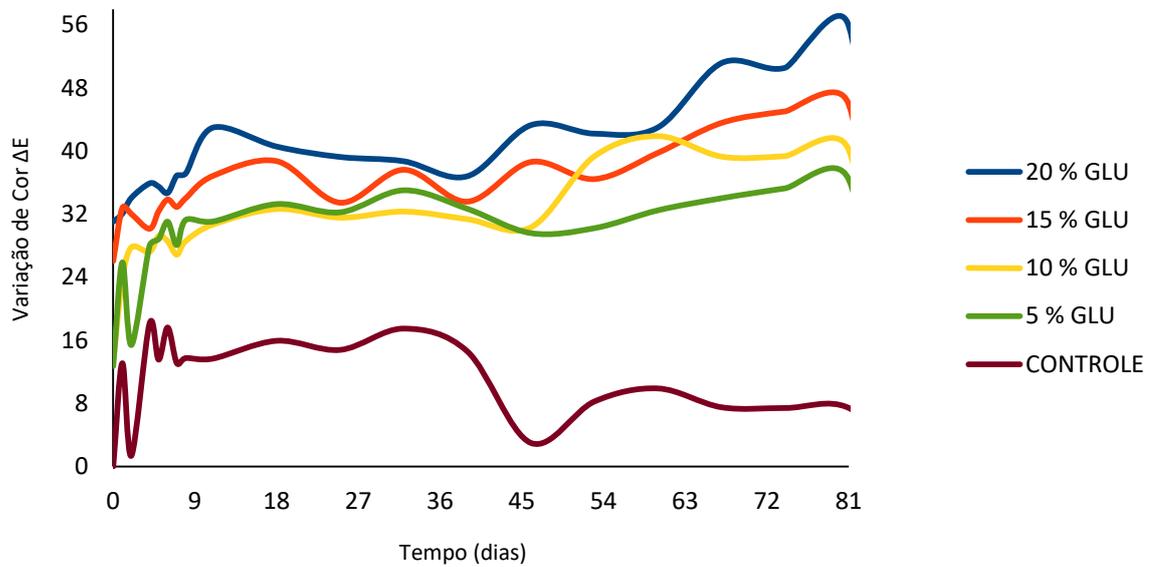
O aspecto visual das espumas no primeiro dia de síntese a após 81 dias de armazenamento encontram-se apresentados na Figura 33.

Figura 33: Cor das espumas sintetizadas com diferentes volumes de glutaraldeído a 50% (m/v) no dia 0 ((**a**) controle (0,0 mL), (**b**) 0,5 mL, (**c**) 1,0 mL, (**d**) 1,5 mL e (**e**) 2,0 mL) e no dia 81 ((**f**) controle (0,0 mL), (**g**) 0,5 mL, (**h**) 1,0 mL, (**i**) 1,5 mL e (**j**) 2,0 mL).

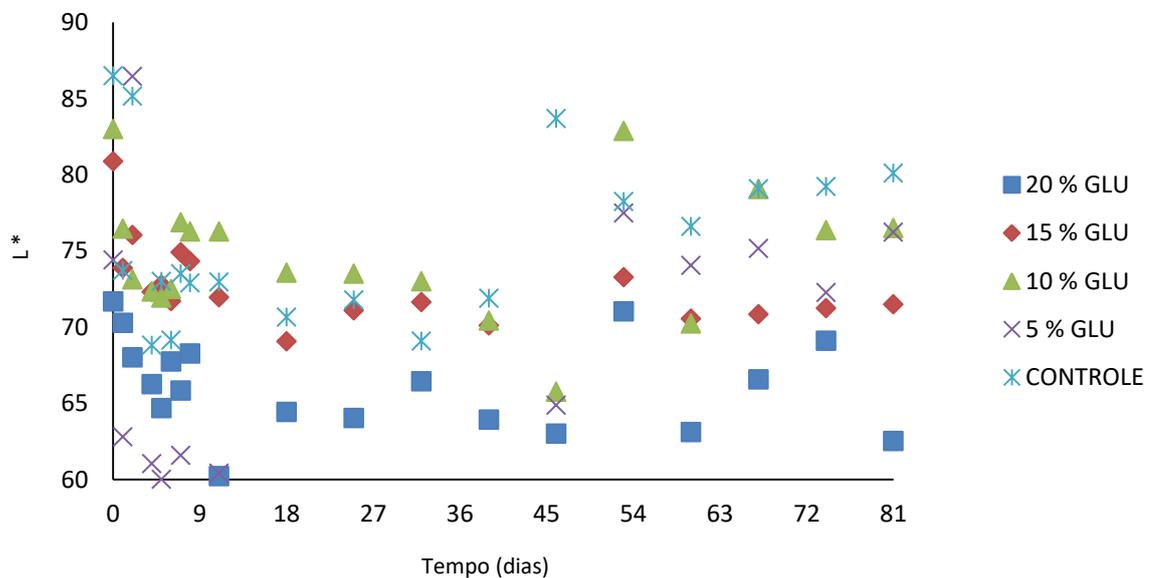


Fonte: O Autor.

A variação da cor total (ΔE), da luminosidade (L^*), dos parâmetros (**a**) e (**b**) em função do tempo de armazenamento por um período de 81 dias encontram-se apresentadas nas Figuras 34, 35, 36 e 37, respectivamente.

Figura 34: Variação de cor total (ΔE) durante armazenamento das espumas.

Fonte: O Autor.

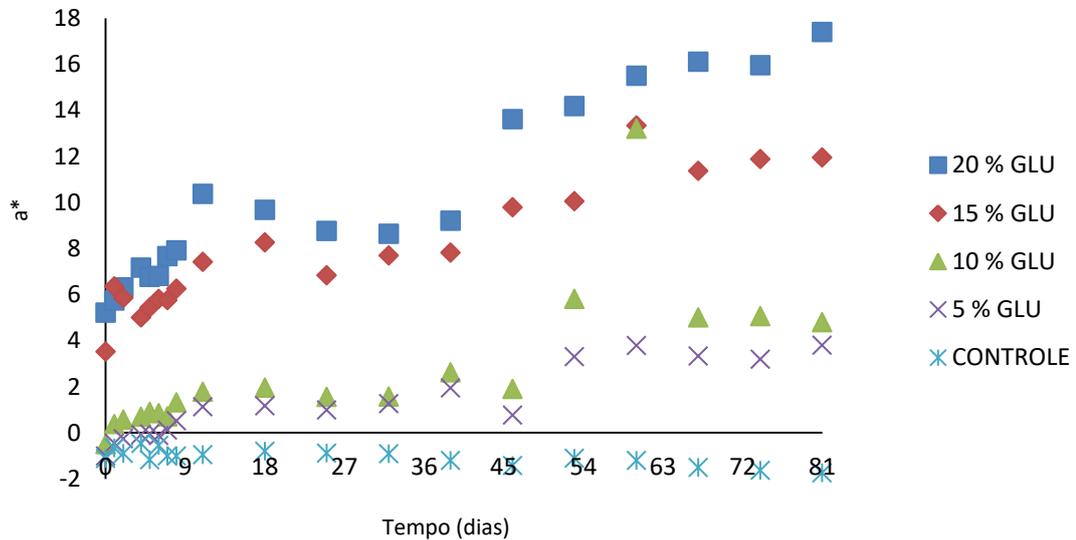
Figura 35: Variação de luminosidade (L^*) total durante armazenamento das espumas.

Fonte: O Autor.

Visualmente observa-se um aumento da intensidade amarela/laranja com a quantidade de glutaraldeído empregada na síntese do suporte ao longo do tempo de armazenamento, como efeito sinérgico das evoluções dos parâmetros a^* (Figura 36) e b^* (Figura 37) das espumas medidas através do colorímetro, que representam tendência ao

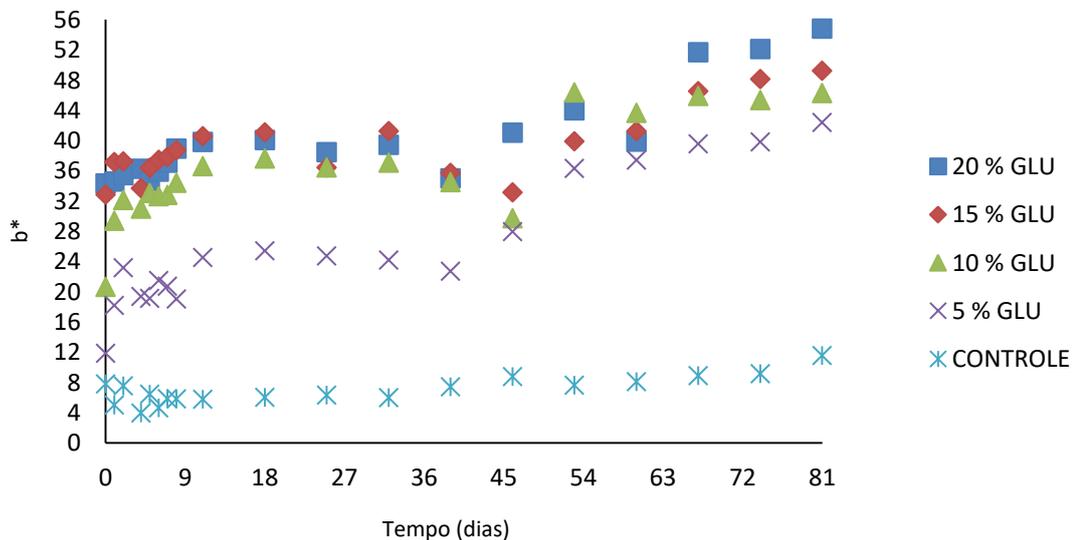
vermelho e tendência ao amarelo respectivamente.

Figura 36: Variação do parâmetro (a^*) durante armazenamento das espumas.



Fonte: O Autor.

Figura 37: Variação do parâmetro (b^*) total durante armazenamento das espumas.



Fonte: O Autor.

Com exceção da luminosidade (L^* - Figura 35), cujos resultados não apresentaram uma tendência plausível de interpretação, as demais variáveis acompanhadas colorimetricamente (ΔE - Figura 34), (a^* - Figura 36) e (b^* - Figura 37) apresentaram

tendências coerentes e que corroboram da os resultados visuais apresentados pelas espumas após a síntese e durante ao armazenamento.

O problema de interpretação dos dados de luminosidade pode ser explicada pelo fato que o suporte é uma superfície irregular e porosa (Figura 33) e o teste mede a luz refletida pela superfície da amostra, então a própria superfície pode não estar sendo irradiada no mesmo ponto e pela característica porosa do suporte, tem-se a possibilidade de em uma análise irradiar a estrutura do poro e em outra análise o poro ser irradiado, que por consequência estas duas superfícies refletem quantidades diversas de luz, o que é apresentado na Figura 33 pela grande dispersão dos dados de luminosidade.

A cor total ΔE (Figura 34) apresentou um aumento significativo na sua variação em função da quantidade de glutaraldeído acrescentada na síntese e com o tempo de armazenamento, estando coerente com o escurecimento observado visualmente (Figura 33) em todas as amostras (exceto o controle).

Para o parâmetro a^* (Figura 36) observa-se um aumento da tonalidade vermelha ao longo do tempo e em função da adição de glutaraldeído, sendo que o controle permaneceu relativamente estável. A mesma tendência foi observada para a variação do parâmetro b^* (Figura 37), o qual está vinculado a tonalidade amarela. Ambas as tendências apresentadas para as tonalidades vermelha e amarela estão coerentes com a variação da cor total, ou seja, com o escurecimento observado para espuma em função da adição do glutaraldeído e do tempo de armazenamento.

Somando os dois efeitos (parâmetros a^* e b), tem-se uma diferenciação de cor mais acentuada para laranja com o aumento de utilização de glutaraldeído, o que está coerente com aumento do valor de ΔE total observado na Figura 34.

Esta evolução observada para a cor, tanto visualmente quanto instrumentalmente, sugere que o mecanismo de incorporação do glutaraldeído ao suporte de poliuretano é uma reação química com características similares ao do escurecimento não enzimático de alimentos (Reação de Maillard), processo esse que resulta no escurecimento dos alimentos, principalmente sob aquecimento, que no caso em questão seria proporcionado caráter exotérmico da reação de polimerização do PU (VILAR, 1999).

Neste caso o glutaraldeído (agente de ligação entre suporte e enzima) apresentaria um comportamento de um açúcar redutor (pelo fornecimento da carbonila), reagindo com a amina secundária do suporte de poliuretano, a qual simularia uma proteína (ao fornecer o nitrogênio de uma amina secundária) para a realização da Reação de Maillard, mecanismo de escurecimento não enzimático.

Cabe destacar que a tendência observada para a cor foi similar a de uma reação de

Maillard, onde condições como temperatura, tempo de estocagem, concentração do açúcar redutor e acidez do meio reacional influenciam na coloração (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O glutaraldeído precisa de nucleófilos para reações de adição nucleofílica no carbono da carbonila, assim como o isocianato (ALLINGER, 1980). Então se conclui que aldeídos não reagem com isocianatos diretamente, e neste caso, o glutaraldeído poderia reagir com o nitrogênio do isocianato após a formação do grupamento uretano pela reação de polimerização.

A possível reação química entre o glutaraldeído e o suporte é de uma reação entre aldeído e amina secundária (com formação de enaminas) sob determinadas condições (VOLLHARDT; SCHORE, 2014). O grupo uretano resultado da reação entre o isocianato e o polioliol apresenta uma estrutura similar aos de uma amina secundária (Figura 38).

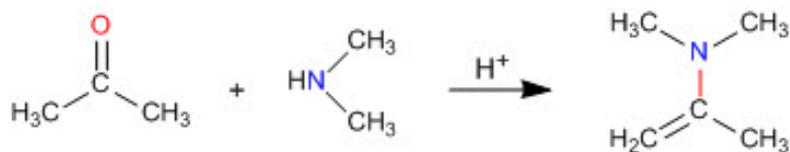
Figura 38: Comparação de estrutura grupo uretano e amina secundária.



Fonte: adaptado de (MORRISON; BOYD, 2011).

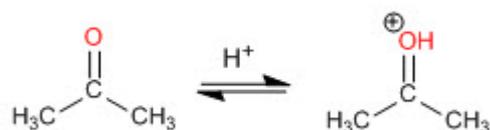
Os compostos carbonilados que contêm ao menos um hidrogênio α reagem com aminas secundárias com perda de água para formar compostos conhecidos como enaminas (Figura 39), os quais contêm um nitrogênio básico diretamente ligado a um carbono olefínico ($R_1NCR=CR_2$), com a reação sendo catalisada pela presença de ácidos. (ALLINGER, 1980; MORRISON; BOYD, 2011; VOLLHARDT; SCHORE, 2014). A formação de enamina (Figura 39) é a reação entre aldeído representado pelo glutaraldeído e amina secundária representada pelo grupo uretano, com mecanismo descrito nas Figuras 40 e 41.

Figura 39: Formação da enamina.



Fonte: adaptado de (MORRISON; BOYD, 2011).

Figura 40: Protonação da carbonila em meio ácido.



Fonte: adaptado de (MORRISON; BOYD, 2011).

Figura 41: Ataque nucleofílico da amina secundária seguido de perda de água.

Figura 41 – a:

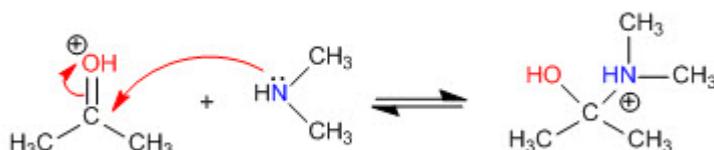


Figura 41 – b:

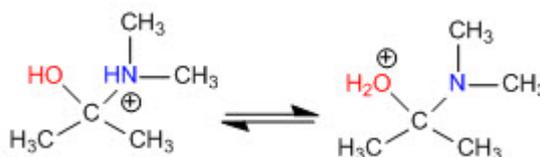


Figura 41 – c:

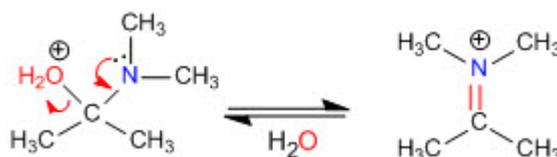
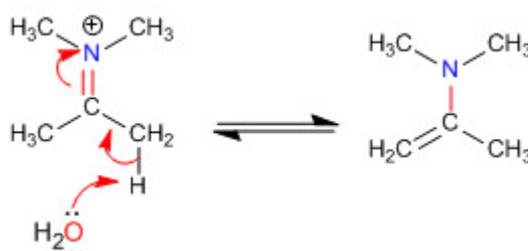


Figura 41 – d:



Fonte: adaptado de (MORRISON; BOYD, 2011).

A reação descrita na Figura 40 é catalisada em meio ácido, que promove a protonação do grupo aldeído (Figura 41) e promove o deslocamento do equilíbrio químico para produtos (incorporação do glutaraldeído na estrutura do suporte), a qual o glutaraldeído (representado pela cetona na Figura 41) é atacado nucleofilicamente pela amina secundária (que representa o suporte na Figura 41), seguido de eliminação de água (VOLLHARDT; SCHORE, 2014).

O mecanismo descrito é similar ao da Reação de Maillard (base de Schiff) que conduz ao escurecimento não enzimático de alimentos sob aquecimento, diferindo em relação a amina reativa (primária na reação de Maillard e secundária no mecanismo proposto).

A incorporação do glutaraldeído na estrutura do suporte é similar à da reação do glutaraldeído para a imobilização por ligação covalente (3.2.1.7) com a enzima (representada pela lipase), com apenas alteração na posição da insaturação.

Quando uma amina primária (enzima – lipase) reage com aldeído (glutaraldeído), a imina protonada perde um próton do nitrogênio na última etapa da reação, produzindo uma dupla ligação ($\text{N}=\text{C}$), denominada base de Schiff (Figura 8). No entanto, quando uma amina secundária (como as presentes na espuma de poliuretano – Figura 38) reage com aldeído, o nitrogênio carregado positivamente não está ligado ao hidrogênio, então a molécula neutra é produzida pela perda de um próton do carbono α , produzindo uma dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$) (Figura 41 d) (ALLINGER, 1980; MORRISON; BOYD, 2011; VOLLHARDT; SCHORE, 2014).

Além disto, sendo o grupo carbonila presente no glutaraldeído muito reativo, o mesmo pode realizar reações de ligação cruzada na estrutura do PU, conduzido a suportes mais rígidos e compactos (VILAR, 1999), porém menos funcionalizados, pois neste caso não haveria aldeídos reativos livres para a reação de imobilização por ligação covalente com a enzima, reduzindo a atividade do suporte pela menor densidade de grupos reativos presentes no suporte.

Com a definição da quantidade de glutaraldeído presente no meio reacional que é de 1,0 mL de solução de glutaraldeído, conforme discussão em 5.3 sobre ensaios de lixiviação foram produzidas espumas com quatro formulações distintas conforme Tabela 11 (**grupos a, b, c e d**), que serão denominadas de espumas **a.2, b.2, c.2 e d.2**. A fim de avaliar qual será o suporte a ser utilizado para o processo de imobilização por ligação covalente e sequencia deste trabalho, cada amostra (espumas **a.2, b.2, c.2 e d.2**) foram conduzidas em ensaios de imobilização de lipase com resultados em 5.5.

5.5 AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

Para os ensaios preliminares de imobilização a condição escolhida para cada suporte base foi a sintetizada empregando 1,0 mL de solução de glutaraldeído 50% (m/v). Esta condição foi escolhida por ser a que apresentou os valores similares em relação a quantidade de glutaraldeído incorporada aos 4 grupos de espumas desenvolvidas, com as massas variando

entre 330 e 482 mg (Tabela 11), sendo para a espuma **a.2** uma massa de 385,1 mg de glutaraldeído incorporado, a espuma **b.2** apresenta 470,5 mg de glutaraldeído, a espuma **c.2** ficou com uma massa de 330,6 mg de glutaraldeído e a espuma **d.2** adquiriu 482,4 mg de glutaraldeído em sua estrutura.

A Tabela 12 apresenta os resultados experimentais referente a imobilização da enzima (lipase) nas quatro formulações testadas, com as condições experimentais de imobilização da lipase descritas em 4.2.2.1, com o objetivo de escolher a formulação da espuma para imobilização por ligação covalente. A atividade inicial disponibilizada (enzima livre na solução-mãe conforme item 4.2.2) para todos os ensaios foi de 571,5 U.

Tabela 12: Otimização da formulação da espuma para imobilização enzimática.

ESPUMA Tabela 11	Massa Espuma (g)	Atividade Enzimática – Equação (4) – 4.2.2.1		RI (%)
		Específica (U / g)	Total (U)	
a.2	1,010	438,1	442,5	77,4 %
b.2	1,022	528,6	540,2	94,5 %
c.2	1,009	809,7	817,1	142,9 %
d.2	1,054	696,3	733,9	128,4 %

RI = Rendimento de Imobilização (Total Atividade / Atividade Disponibilizada) x 100

Fonte: O Autor.

A espuma produzida com apenas glutaraldeído (**Tabela 11 – a.2**) no meio reacional teve o menor rendimento de imobilização, visto que as reações com aldeídos para a incorporação do glutaraldeído à espuma são reações de equilíbrio (conforme discussão sobre a alteração de cor do suporte em 5.4 através das **Figuras 39, 40 e 41**) e não há nenhum elemento que possa deslocar o equilíbrio para o sentido da incorporação do glutaraldeído à espuma (no caso uso de catálise ácida). Mesmo o glutaraldeído sendo uma molécula reativa, dentro do meio reacional ela é menos reativa do que o isocianato que apresenta o mesmo mecanismo reacional (VOLLHARDT; SCHORE, 2014). Mesmo com uma massa de glutaraldeído incorporado ao suporte (Tabela 11) para a espuma **a.2** (385,1 mg) ser superior ao observado na espuma **c.2** (330,6 mg), a espuma **a.2** apresentou um rendimento de imobilização quase a metade da espuma **c.2**, que teve a adição de ácido no meio reacional. Conclui-se então para a espuma **a.2** que o glutaraldeído incorporado em sua estrutura não estava igualmente disponível para a imobilização da lipase por ligação covalente em

comparação com a espuma **c.2**.

A espuma que foi produzida com solução de glutaraldeído e glicerina (**b.2**), apresentou melhora na atividade do suporte em comparação com a espuma **a.2**, provavelmente devido as mudanças conformacionais proporcionadas pela glicerina no suporte, um monômero com três funcionalidades que possibilita a reticulação do polímero (ALLINGER, 1980). Sua presença pode estar possibilitando a produção de hemiacetais com duas hidroxilas, os quais poderiam continuar a reação de polimerização e com isso favorecer a incorporação do glutaraldeído. Além do que estas espumas apresentaram-se com mais efeitos de reticulação do que as espumas produzidas com apenas polioli e isocianato, o que pode ter melhorado a distribuição dos tamanhos das células e com isso aumentar área de contato por unidade de volume e, por consequência, atividade enzimática .

Com a adição de ácido inorgânico (H_3PO_4) na etapa de síntese dos suportes observa-se as melhores atividades dos imobilizados e rendimentos de imobilização, com duas espumas (**c.2** e **d.2**) conduzindo a imobilizados com as maiores atividades do sistema suporte/enzima, com valores de atividade enzimática iguais a 817,1 U/g e 733,9 U/g, respectivamente (Tabela 12). Entre estes suportes (**c.2** e **d.2**) o sintetizado a temperatura ambiente (23 – 25°C) (**c.2**), com atividade de 817,1 U/g, obteve a maior atividade, sugerindo que a temperatura na etapa de síntese da espuma afeta negativamente nas características do suporte.

A acidificação do meio favorece tanto a produção de hemiacetais, quanto a reação entre o aldeído e uma amina secundária para formação de enaminas (Figura 39). Além disto, a síntese em meio ácido conduziu a espumas mais expandidas possibilitando uma melhora no sistema de difusão do substrato até os sítios ativos da espuma. Em paralelo a isso, tem-se o efeito sinérgico da utilização de glicerina nas espumas que melhorou a distribuição de tamanho de poros por causa da reticulação do suporte aumentando a área de contato da espuma, o que justificaria o aumento da atividade do imobilizado.

Buscando a otimização do processo de imobilização por ligação covalente foram conduzidos novos ensaios de imobilização, variando tempo de contato do suporte com solução contendo lipase, temperatura e pH, conforme planejamento experimental em 4.2.2. Para estes ensaios empregou-se como suporte o sintetizado em meio ácido a temperatura ambiente (**Tabela 12 – c.2**), visto que foi o suporte que apresentou a maior atividade enzimática, com valor igual a 817,1 U/g.

5.6 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS E CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO

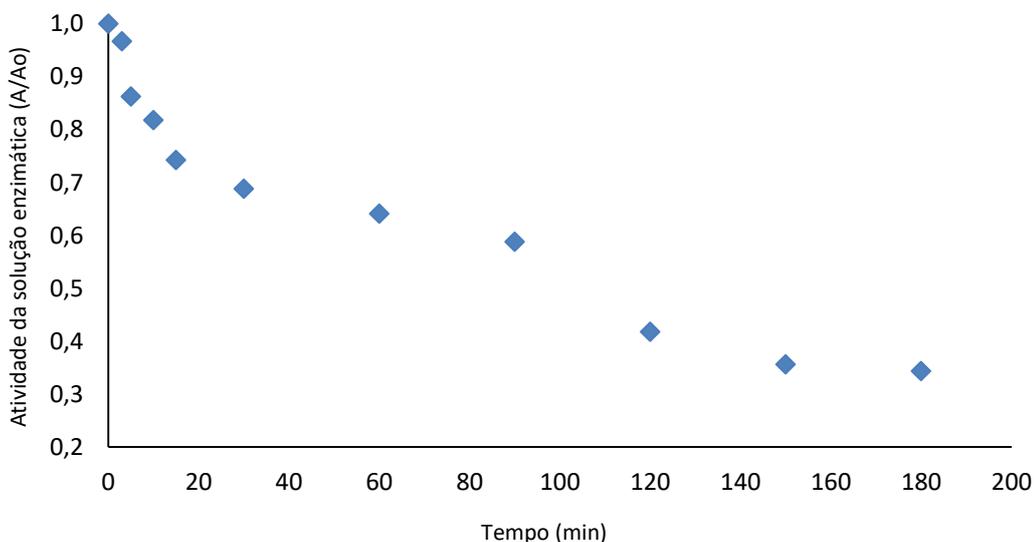
Para a otimização do processo de imobilização foi conduzido um planejamento experimental (4.2.2), cujas variáveis foram temperatura e pH.

Previamente foi conduzido um estudo cinético com a condição teoricamente mais desfavorável, ou seja pH 6 e temperatura de 20 °C. A desprotonação de aminoácidos é condição essencial para que ocorra imobilização por ligação covalente e ocorre quando o pH do meio é superior ao ponto isoelétrico (PI) deste aminoácido. Em em pH 6 há menor quantidade de aminoácidos desprotonados em relação as outras duas condições experimentais (pH 8 e pH 10) (Tabela 17), caracterizando então para a alcalinidade do meio reacional o pH 6 condição como a menos favorável para imobilização enzimática. A velocidade de reações químicas é reduzida em função da redução da temperatura, portanto como a condição de temperatura de 20°C é a menor de todas do planejamento experimental (40 e 60°C), sugerindo que para esta temperatura o processo de imobilização por ligação covalente apresentaria as menores taxas de reação de Schiff.

A evolução da atividade do meio reacional (solução-mãe conforme descrito em 4.2.2) em função do tempo é apresentada na Figura 42, em que a queda da atividade do meio observada ao longo do tempo pode ser relacionada ao processo de imobilização por ligação covalente, ou seja, a lipase que estava livre inicialmente na solução-mãe com um dos seus aminoácidos desprotonados e esta aminoácido apresentado alinhamento adequado com o glutaraldeído do suporte para a realização da reação de Schiff, ocorrendo assim a transferência da enzima da solução-mãe para o suporte. Os platôs apresentados na Figura 42 nos intervalos de tempo (30 – 90 min e após 150 – 180 min) apresentam o equilíbrio entre a taxa de imobilização enzimática e a dessorção da enzima pela hidrólise da ligação C=N característica da reação de Schiff.

Observa-se uma diminuição da atividade do meio reacional com o tempo, apresentando os melhores resultados entre 150 e 180 minutos reacionais, que é a maior redução da atividade do meio, resultando em maior quantidade de lipase imobilizada no suporte. Neste contexto, para o ensaio de otimização da imobilização estipulou-se o tempo de contato em 160 minutos. As atividades dos imobilizados (U/g) obtidos após 160 minutos de reacionais, seguido de 3 lavagens com água (1 g de suporte para 50 mL) estão apresentadas na Tabela 13.

Figura 42: Atividade relativa da solução enzimática em função do tempo de contato com o suporte para o processo de imobilização conduzido com pH 6 a 20°C.



Fonte: O Autor.

Tabela 13: Valores reais e codificados para a resposta de atividade enzimática dos imobilizados após 160 minutos reacionais.

Ensaio	Variáveis		Atividade do Imobilizado (U/g)
	pH (X ₁)	Temperatura (°C) (X ₂)	
1	6 (-1)	20 (-1)	98,25
2	10 (1)	20 (-1)	559,62
3	6 (-1)	60 (1)	196,50
4	10 (1)	60 (1)	445,67
5	8 (0)	40 (0)	263,40
6	8 (0)	40 (0)	294,06
7	8 (0)	40 (0)	237,51

Fonte: O Autor.

Utilizando a ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta (Figura 43) é possível investigar a influência de determinadas variáveis em um processo e a forma de interação entre estas variáveis, bem como obter o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados.

Com os resultados experimentais (Tabela 13), a partir do planejamento fatorial, é possível ajustar os dados para obter um modelo linear que relacione a atividade enzimática do suporte (U/g) com os parâmetros estudados (temperatura e pH). É bom lembrar que o modelo

obtido é empírico sendo aplicável apenas em uma determinada região estudada (Tabela 9). As Tabelas 14, 15 e 16 apresentam respectivamente os dados de efeitos estimados, coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) para os dados experimentais a fim de otimizar o processo de imobilização por ligação covalente.

Tabela 14: Valores estimados para o processo de imobilização por ligação covalente da lipase com os dados experimentais da Tabela 13.

Factor	Effect Estimates; Var.: Atividade (U/g); R-sqr = 0,94647; Adj: 0,89295 (Spreadsheet2 2 factors, 1 Blocks, 7 Runs; MS Residual = 2592,762) DV: Atividade (U/g)			
	Effect	Std. Err.	t (3)	p
Mean / Interc	299,287	19,24564	15,5509	0,000578
(1) pH (1L)	355,270	50,91917	6,9771	0,006043
(2) Temperatura (°C) (2L)	-7,850	50,91917	-0,15417	0,887266
1L by 2L	-106,100	50,91917	-2,08369	0,128548

Fonte: O Autor.

Tabela 15: Coeficiente de regressão para o processo de imobilização por ligação covalente da lipase com os dados experimentais da Tabela 13.

Factor	Effect Estimates; Var.: Atividade (U/g); R-sqr = 0,94647; Adj: 0,89295 (Spreadsheet2 2 factors, 1 Blocks, 7 Runs; MS Residual = 2592,762) DV: Atividade (U/g)			
	Effect	Std. Err.	t (3)	p
Mean / Interc	299,287	19,24564	15,55091	0,000578
(1) pH (1L)	177,635	25,45959	6,97714	0,006043
(2) Temperatura (°C) (2L)	-3,9250	25,45959	-0,15417	0,887266
1L by 2L	-53,0500	25,45959	-2,08369	0,128548

Fonte: O Autor.

Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) para o processo de imobilização por ligação covalente da lipase com os dados experimentais da Tabela 13.

Factor	Effect Estimates; Var.: Atividade (U/g); R-sqr = 0,94647; Adj: 0,89295 (Spreadsheet2 2 factors, 1 Blocks, 7 Runs; MS Residual = 2592,762) DV: Atividade (U/g)				
	SS	df	MS	F _{cal}	F _{tab} 5%
(1) pH (1L)	126216,7729	1	126216,8	33,04602	6,6079
Error	19097,1	5	3819,424	F _{cal} / F _{tab}	5,0010
Total SS	145313,9	6			

Fonte: O Autor.

Analisando as Tabelas 14 e 15, apenas o pH apresenta correlação positiva na atividade

do imobilizado, com a temperatura com correlação negativa em relação à atividade do conjunto suporte enzima.

Os dados experimentais (Tabela 13) foram tratados estatisticamente e o modelo obtido para a atividade da lipase imobilizada por ligação covalente em suporte de poliuretano funcionalizado com glutaraldeído está descrito na Equação 5, apresentando coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9319. Este dado quantifica a qualidade do ajustamento, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, com valores no intervalo entre 0 e 1 (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

$$Y = 299,287 + 177,635X_1 \quad (5)$$

Sendo:

Y = Atividade do imobilizado (lipase imobilizada covalentemente à espuma) - (U/g);

X_1 = Valor codificado para pH do meio para o processo de imobilização por ligação covalente [-1 (6); 0 (8); +1 (10)].

O teste F (Tabela 16) apresenta a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} , sempre que esta relação for maior que um a regressão é estatisticamente significativa havendo relação entre as variáveis independentes (pH e/ou temperatura) e dependente (atividade do suporte). Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS NETO *et al.*, 1996).

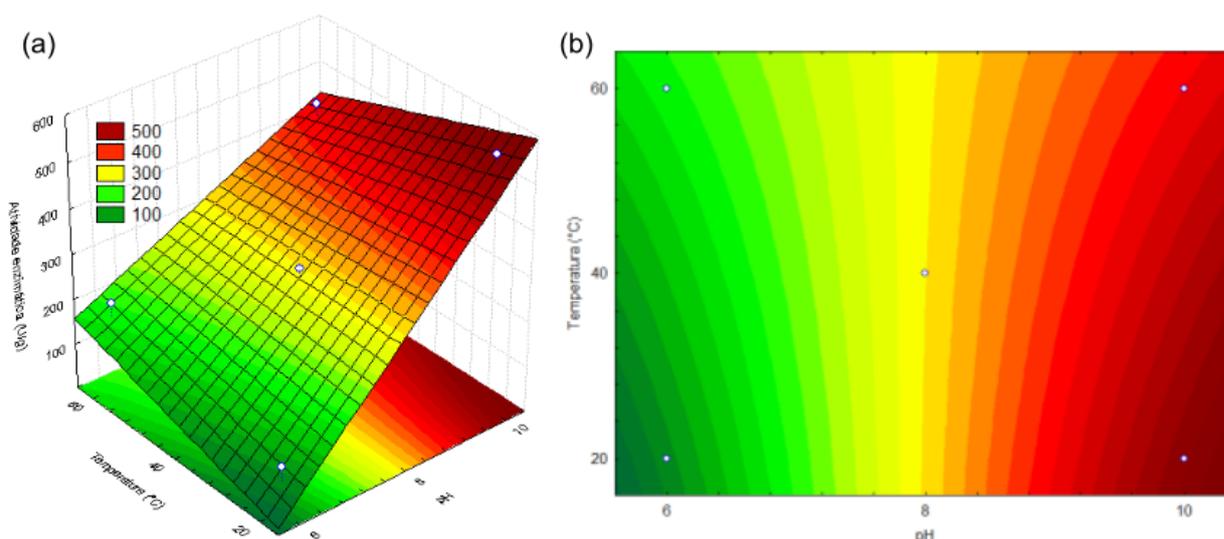
Neste caso o modelo apresentado na Equação 5 tem 93,2% das variações obtidas explicadas pelo modelo e com um valor da razão de $F_{\text{calculado}}$ por F_{tabelado} de 5,00; indicando que o modelo além de ser estatisticamente significativo com 95% de confiança, pode ser utilizado para fins preditivos (BARROS NETO *et al.*, 1996).

A fim de melhor visualização dos efeitos da pH do meio e da temperatura no processo de imobilização por ligação covalente foram construídas através de programa estatístico a superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 43), informando que com o aumento de pH em que ocorre a imobilização por ligação covalente há aumento na atividade do suporte. Enquanto para a temperatura ocorre dois efeitos distintos com a atividade do suporte em função do pH do meio em que ocorre o processo de imobilização enzimática pro ligação covalente, o que pode justificar que para a análise estatística a temperatura não se encontra no modelo proposto.

Em relação à variável pH observa-se um efeito positivo com relação a atividade do

imobilizado (Figura 43 – a), independente da temperatura empregada nos ensaios de imobilização 20 ou 60 °C. Em ambas as temperaturas os imobilizados produzidos em pH 10, por exemplo, apresentaram valores de atividade muito superiores (até 5 vezes maior) em relação aos imobilizados gerados em pH 6 na mesma temperatura. Num contexto geral, a atividade dos imobilizados (U/g) aumentou com o incremento de pH do meio nesta faixa estuda. Os ensaios conduzidos em pH 10 apresentaram as maiores atividades (559,6 e 445,6 U/g a 20 e 60°C – Tabela13), além de ter ocorrido aumento da atividade do suporte com uma imobilização em pH 8 em comparação com as atividades medidas para os imobilizados produzidos em pH 6.

Figura 43: Superfície de Resposta (a) e Curva de Contorno (b) para a imobilização por ligação covalente da lipase em espuma de poliuretano funcionalizada com glutaraldeído.



Fonte: O Autor.

Com a curva de contorno (Figura 43 – b) observou que a temperatura apresenta caráter anfótero em relação à atividade do suporte, então o efeito da temperatura depende da alcalinidade do meio em que ocorre o processo de imobilização por ligação covalente, o imobilizado podendo ter aumento ou diminuição de sua atividade. Em pH 10, o aumento de temperatura provocou uma redução na atividade do suporte (559,62 U/g em 20°C para 445,67 U/g a 60°C – Tabela 13), enquanto que para pH 6, o aumento de temperatura provocou um aumento na atividade do suporte (98,25 U/g em 20°C para 196,50 U/g a 60°C – Tabela 13). Fato este que pode explicar o motivo para qual a temperatura não apresentou correlação positiva na análise estatística (Tabelas 14 e 15).

Com o intuito de descrever as influências de temperatura e de pH no processo de imobilização por ligação covalente analisados estatisticamente com as Tabelas 14, 15 e 16 e

pela Figura 43 é necessário o entendimento do processo de interação enzima e suporte através da metodologia de ligação covalente.

Serão abordados em separado as influências do meio (pH e temperatura), sendo observado efeito positivo do pH em que ocorre a imobilização (aumento de pH promove aumento de atividade do suporte) e o efeito anfótero que a temperatura teve neste processo (em meio ácido, com o aumento de temperatura houve aumento de atividade do suporte enquanto em meio alcalino o aumento de temperatura promoveu redução na atividade do imobilizado).

A multi interação entre enzima e suporte funcionalizado requer tempo para que ocorra e para evitar a inativação da enzima ou a quebra da ligação é usual se utilizar no máximo temperatura ambiente (em torno de 25°C). Estas multi interações podem melhorar a estabilidade térmica e resistência química da enzima assim como podem reduzir a atividade enzimática pela ligação química de aminoácidos presentes no sítio catalítico ao suporte, sendo esta resposta importante para definir as melhores condições de imobilização, estando relacionada com a desprotonação de aminoácidos presentes na enzima (GUISÁN *et al.*, 1988; BARBOSA *et al.*, 2013)

A enzima somente pode realizar uma interação covalente com o suporte em pontos nos quais estão presentes aminoácidos desprotonados em função do pH do meio reacional, podendo ser do sítio catalítico ou não, com a formação de bases instáveis de Schiff (ligação insaturada C=N), em se tratando de reações entre aldeídos (glutaraldeído) e aminas primárias (aminoácidos). A base de Schiff pode sofrer reações de hidrólise resultando em uma enzima livre e perda de atividade do suporte, sendo esta reação promovida pelo aumento da temperatura do meio reacional em que o processo de imobilização está submetido, tanto em meio alcalino quanto em meio ácido pode ocorrer a reação de hidrólise da base de Schiff. Discutiremos este duplo efeito da temperatura na atividade do suporte em função da alcalinidade do meio reacional, ou seja, os resultados efetivos da reação de hidrólise da base de Schiff sobre a atividade do sistema espuma-enzima.

Em meio alcalino o efeito negativo da temperatura em relação à atividade do suporte pode estar relacionada à diminuição da quantidade de ligações entre enzima e suporte, devido a quebra das ligações entre enzima e suporte, diminuindo a densidade de enzimas no suporte que tem sua medida indireta pela atividade do suporte, o que pode-se observar nas condições de pH 10 (Tabela 13) com as temperaturas de 20 e 60°C, em que as atividades do suporte eram de 559,62 e 445,67 U/g, respectivamente, com a quantidade de aminoácidos desprotonados sendo a mesma pela mesma condição de pH do meio. Fato este observado através da superfície de resposta (Figura 43).

O efeito positivo da temperatura em meio ácido em relação à atividade do suporte pode estar relacionada pela redução de ligações da enzima com o suporte que estejam relacionadas ao seu sítio catalítico (Figura 44), deixando o sítio catalítico livre porém com outros aminoácidos desprotonados ligados covalentemente com o suporte, resultando em aumento da atividade do suporte. Fato este observado através da superfície de resposta (Figura 43) e com os dados de atividade do suporte em pH 6 (Tabela 13) com as temperaturas de 20 e 60°C, em que as atividades do suporte eram de 98,25 e 196,50 U/g, respectivamente, com a quantidade de aminoácidos desprotonados sendo a mesma pela mesma condição de pH do meio. Fato este observado através da superfície de resposta (Figura 43).

Em relação ao pH, o mesmo interfere na protonação ou desprotonação dos resíduos – NH₂ dos aminoácidos. Cabe destacar que a forma desprotonada é a mais reativa para a reação de Schiff, responsável pela imobilização covalente da enzima com o suporte.

Neste contexto a principal propriedade dos aminoácidos é seu ponto isoelétrico (pI), o qual corresponde ao pH onde a carga superficial é neutra. Em pH's inferiores ao pI ocorre a protonação do aminoácido e em pH's superiores a desprotonação. A Tabela 17 apresenta alguns aminoácidos com seus respectivos pontos isoelétricos.

Levando-se em consideração a reatividade dos grupos e a estabilidade da ligação formada, o resíduo de aminoácidos mais convenientes para se ligar a suportes, desde que estejam desprotonado, ou seja, em pH's superiores aos seus pI, são, em ordem decrescente: Lys, Cys, Tyr, **His**, **Asp**, **Glu**, Arg, Trp, **Ser**, Thr e Met, com suas estruturas moleculares apresentadas na Tabela 18. Outros aminoácidos (Grupos R = Não polares e Aromáticos – Tabela 17), devido a seu caráter hidrofóbico, não se encontram expostos para o exterior da superfície proteica, e não podem intervir na ligação covalente (GUISÁN *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2007).

Em relação as lipases, sua determinação estrutural através de técnicas cristalográficas revelou que as mesmas compartilham um padrão conformacional comum, com o sítio catalítico formado pela tríade (**Ser** – **Hist** – **Asp / Glu**), com mecanismo de atuação de lipase descrita através da Figura 44 e seus respectivos pI na Tabela 17. Com exceção da Histidina (Hist), todos os demais aminoácidos presentes no sítio catalítico da lipase, apresentam ponto isoelétrico (pI) inferior a 6,0, ou seja, apresentam-se desprotonados em pH 6 e passíveis de realizar a reação de Schiff, tornando-os reativos para se ligarem covalentemente ao suporte, característica esta pouco desejável, uma vez que a ligação covalente com os aminoácidos do sítio catalítico pode conduzir a uma redução da atividade da enzima, contribuindo assim para a menor atividade observada para os imobilizados sintetizados em pH 6 (JAEGER; REETZ, 1998; RIOS *et al.*, 2018).

As lipases também apresentam em sua estrutura a Lisina (Lys), um dos aminoácidos preferenciais para processos de imobilização por ligação covalente devido ao mesmo não fazer parte de seu sítio catalítico. No entanto, devido ao seu ponto isoelétrico elevado (9,74 – Tabela 17) é um dos com menor prioridade reativa para a reação de Schiff em pH's inferiores a seu pI, pois em sua forma protonada e com grande cadeia lateral (Tabela 18) torna-se um impedimento estérico neste caso, pois em suas formas protonadas os aminoácidos não realizam a ligação de Schiff.

Neste contexto a melhora na atividade dos imobilizados (U/g) com o aumento do pH ($6 < 8 < 10$) foi vinculada a uma imobilização mais eficiente das enzimas ao suporte, mediante a disponibilização de outros aminoácidos desprotonados, como Histidina (pI = 7,59) em pH 8 e, a Histidina e Lisina (pI = 9,74) em pH 10; ampliando assim as possibilidades de interações por ligação covalente da enzima com o suporte, possibilitando a síntese de um imobilizado multipontual (BLANCO e GUISÁN, 1988). Além disto, outros aminoácidos desprotonados não vinculados aos sítios ativos da lipase podem estar realizando a ligação com o suporte, ou seja, a ligação covalente do suporte a estes sítios de aminoácidos não irá prejudicar a atividade da enzima, observada pela atividade do imobilizado.

Em relação a Lisina, o seu acoplamento químico ao suporte irá, devido a sua cadeia lateral grande (Tabela 18), dificultar, mediante impedimento estérico, a interação dos demais aminoácidos reativos, presentes no sítio catalítico, com o suporte, reduzindo assim possíveis inativações durante a imobilização, contribuindo assim para a maior atividade observada par os ensaios conduzidos em pH 10.

Cabe destacar que outros grupos funcionais da enzima, como grupos carboxilatos de moléculas de aspartato e glutamato, fenólico da tirosina, sulfídrico da cisteína, hidroxílico da serina, treonina e tirosina, imidazol da histidina e indol do triptofano, também podem se ligar covalentemente aos grupos reativos do suporte, que pode em alguns casos utilizar outras moléculas para a realização da ligação covalente como a epicloridrina e o glicidol (MENDES *et al.*, 2011). Estas reações também são dependentes do pH do meio e sua relação com o ponto isoelétrico, de impedimentos estéricos e da natureza nucleofílica dos mesmos frente ao grupo carbonila do suporte.

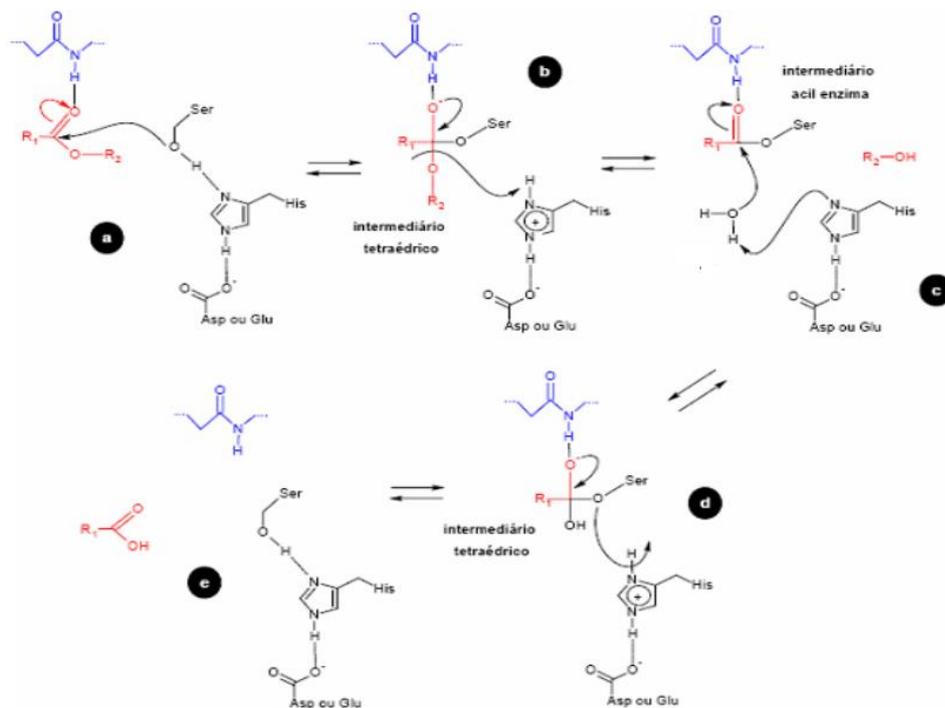
O número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais tanto da enzima quanto do suporte e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte.

Devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo de lipases e proteases, o mecanismo catalítico para lipase segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma serina

protease. O mecanismo de atuação da lipase (**Figura 44 a – e**) é composto por cinco etapas (JAEGER *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012):

- 1) A amina presente no resíduo de **His** do sítio ativo da enzima aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da **Ser** através de uma ligação de hidrogênio, desprotonando-a (**a**).
- 2) O grupo hidroxila da **Ser** (catalisado por **Asp** e **His**) age como uma base atacando nucleofilicamente o carbono suscetível da ligação éster do grupo éster ou ácido do substrato, abrindo a ligação **C=O**. Nesta fase, a **His** atrai o hidrogênio liberado pela **Ser** e o **Asp** ou o **Glu** estabilizando a carga positiva que se forma na **His**. Ocorre a formação de um intermediário tetraédrico (complexo enzima-substrato), que é estabilizado por ligações de hidrogênio formadas com as ligações amida (**b**).
- 3) Após a sua estabilização o intermediário tetraédrico é desfeito pelo retorno da ligação **C=O** e consequente clivagem da ligação éster liberando assim um álcool, cujo oxigênio recebe um próton proveniente da **His**, formando-se assim um complexo acilenzima (**c**).
- 4) O passo de desacilação, um nucleófilo, geralmente molécula de água, ataca a enzima acetilada, abrindo assim a ligação **C=O**, formando um segundo intermediário tetraédrico (**d**).
- 5) O resíduo de **His** doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo de **Ser**, a ligação éster entre **Ser** e grupo acil é quebrada, levando a liberação do produto (ácido carboxílico) pelo retorno da ligação **C=O** e regeneração do sítio catalítico liberando a enzima (**e**).

Figura 44: Mecanismo catalítico da lipase.



Fonte: adaptado de JAEGER *et al.* (1999).

Se a ligação covalente entre enzima e suporte ocorrer entre um dos aminoácidos da lipase (Figura 44) pode ocorrer uma deformação no sítio catalítico da enzima prejudicando a atividade catalítica do imobilizado.

A Tabela 17 apresenta os pontos isoelétricos (PI) dos aminoácidos presentes nas enzimas, sendo esta propriedade fundamental para o processo de imobilização enzimática por ligação covalente.

Tabela 17: Propriedades de Aminoácidos.

Aminoácido	Símbolo	pKa			pI
		pK ₁ (-COOH)	pK ₂ (-NH ₃ ⁺)	pK ₃ (Grupo R)	
Nº Grupo R Não Polar Alifático					
1	Glicina	Gly	2,34	9,60	5,97
2	Alanina	Ala	2,34	9,69	6,01
3	Prolina	Pro	1,99	10,96	6,48
4	Valina	Val	2,32	9,62	5,97
5	Leucina	Leu	2,36	9,60	5,98
6	Isoleucina	Ile	2,36	9,68	6,02
7	Metionina	Met	2,28	9,21	5,74
Nº Grupo R Aromáticos					
8	Fenilalanina	Phe	1,83	9,13	5,48
9	Tirosina	Tyr	2,20	9,11	10,07
10	Triptofano	Trp	2,38	9,39	5,89
Nº Grupo R Polares sem Carga Elétrica					
11	Serina	Ser	2,21	9,15	5,68
12	Treonina	Thr	2,11	9,62	5,87
13	Cisteína	Cys	1,96	10,28	8,18
14	Asparagina	Asn	2,02	8,80	5,41
15	Glutamina	Gln	2,17	9,13	5,65
Nº Grupo R Positivamente Carregado					
16	Lisina	Lys	2,18	8,95	10,53
17	Histidina	His	1,82	9,17	6,00
18	Arginina	Arg	2,17	9,13	12,48
Nº Grupo R Negativamente Carregado					
19	Ácido Aspártico	Asp	1,88	9,60	3,65
20	Ácido Glutâmico	Glu	2,19	9,67	4,25

Fonte: LEHNINGER *et al.* (2014).

Tabela 18: Estrutura molecular de aminoácidos que realizam ligação de Schiff (desprotonados), em ordem decrescente de preferência.

Nome – N° (Tabela 17)	Lisina – 16	Cisteína – 13	Tirosina – 9	Histidina – 16
Estrutura Molecular				
PI (Tabela 17)	9,74	5,07	5,66	7,59
Sítio Catalítico?	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
Nome – N°	Aspartato – 19	Glutamato – 20	Arginina – 18	Triptofano – 10
Estrutura Molecular				
PI (Tabela 17)	2,77	3,22	10,76	5,89
Sítio Catalítico?	SIM	SIM	NÃO	NÃO
Nome – N°	Serina – 11	Treonina – 12	Metionina – 7	
Estrutura Molecular				
PI (Tabela 17)	5,68	5,87	5,74	
Sítio Catalítico?	SIM	NÃO	NÃO	

Fonte: GUISSÁN *et al.* (2006); MATEO *et al.* (2007); LEHNINGER *et al.* (2014).

A Tabela 18 apresenta a estrutura molecular de alguns aminoácidos que podem realizar o processo de ligação covalente, em que estão apresentados em ordem decrescente os aminoácidos com a preferência em realizar a ligação de Schiff nas condições de desprotonação dos aminoácidos, ou seja, em condições de pH do meio acima de seu ponto isoelétrico (PI), iniciando-se da Lisina (mais preferencial) e terminando com a Metionina (menos preferencial).

5.7 IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE *versus* ADSORÇÃO

Para fins comparativos e verificar a contribuição da adsorção no processo de imobilização, a condição experimental de imobilização que apresentou a melhor atividade para o imobilizado (pH 10, 20 °C e 160 minutos) foi empregada para simular uma imobilização empregando como suporte uma espuma não funcionalizada com glutaraldeído, sendo neste caso o caráter hidrofóbico do suporte uma importante característica para imobilizar a enzima via processo de adsorção. Após a imobilização o suporte foi lavado três vezes com água (1 g de suporte para 50 mL), antes de ser seco e submetido a análise de sua atividade, para fins de comparação com o processo de imobilização por ligação covalente.

A Tabela 19 apresenta os resultados de atividade obtidos para os dois imobilizados, um produzido com espuma funcionalizada com glutaraldeído e outro não, com média e desvio padrão após a avaliação destes processos em triplicata.

Tabela 19: Comparação entre métodos de imobilização.

Atividade (U / g)	Adsorção	Ligação Covalente
		119,6 ± 4,59

Fonte: O Autor.

O imobilizado gerado empregando o suporte funcionalizado (ligação covalente) apresentou uma atividade de esterificação de 535,7 U/g, a qual é aproximadamente 4,5 vezes superior a observada para o imobilizado produzido empregando como suporte a espuma de poliuretano sintetizada na ausência de glutaraldeído (119,6 U/g), cuja imobilização provavelmente esteja ocorrendo preferencialmente por adsorção.

Cabe destacar a atividade observada para o imobilizado com o suporte funcionalizado apresentou uma boa reprodução da atividade em relação ao teste anterior, onde a atividade foi de 559,6 U/g (Tabela 14), indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

A presença do glutaraldeído está proporcionando a espuma de PU uma maior reatividade, mediante a incorporação de novos grupos funcionais em sua estrutura, como grupos aldeído e cetona. Destes grupos, os aldeídos são reativos para a reação de Schiff, possibilitando a imobilização por ancoragem química (ligação covalente), enquanto as carbonilas, com seu caráter polar, podem contribuir para uma melhora no processo de adsorção física. Ambos os casos contribuindo para o melhor desempenho observado para o suporte funcionalizado em relação ao não funcionalizado, destacando a potencialidade do suporte produzido.

O caráter inovador desta metodologia e o seu potencial para aplicações está mais evidente ao observar a Tabela 20, com outros trabalhos utilizando lipases em diferentes suportes, fontes e métodos de imobilização enzimática.

Comparar apenas os resultados de outros trabalhos com observação do parâmetro de atividade do suporte (U/g) no campo do conhecimento das enzimas pode apresentar discussões com pouca profundidade, visto que há diferentes metodologias de imobilização (3.2), suportes, condições operacionais, procedimentos de análise de atividade e até mesmo microrganismos geradores de lipase (Tabela 20), todavia há um denominador comum nestes diversos trabalhos e que pode ser utilizado como um parâmetro de comparação com bons resultados para efeito de análise, que é o rendimento de imobilização ou a comparação da atividade do suporte em um determinado método de imobilização com a atividade da enzima livre.

Wan *et. al* (2018) conseguiram uma atividade do suporte 112% maior em comparação à livre mesmo com uma atividade do suporte de 3.176 U/g, Mehdi *et. al* (2018) obtiveram um rendimento de 46% na imobilização por adsorção, 40,5% na ligação iônica e 65,5% para ligação covalente, Gao *et. al* (2018) alcançaram um rendimento de 58,3% na imobilização, Ferreira *et. al* (2018) chegaram a um rendimento de 50% na imobilização, Lisboa *et. al* (2018) adquiriram um rendimento de 120% na imobilização, Poppe *et. al* (2018) conquistaram um rendimento de 94% na imobilização, Sarno *et. al* (2017) alcançaram um rendimento de 144% na imobilização, assim como Xie e Huang (2018) conseguiram um rendimento de imobilização de 85,5% e 5 ciclos.

O número de ciclos que um processo de imobilização enzimático pode introduzir em uma determinada enzima também é um parâmetro para efeitos de comparação, pois mesmo com uma queda de atividade que um suporte produz no imobilizado pode ser compensado pelo aumento de número de reações consecutivas que a enzima pode realizar, portanto é desejável metodologias com maiores quantidade de ciclos a fim de reduzir custos operacionais dos processos enzimáticos. Cai *et. al* (2018) conseguiram 10 ciclos da lipase

assim como Jin *et al.* (2018), sendo esta avaliação não determinada neste trabalho.

Tabela 20: Trabalhos de imobilização enzimática de lipase.

Referência	Lipase	Método	Suporte	Atividade (U/g)
QUILLES <i>et al.</i> (2015)	<i>Candida antarctica</i> (Cal-B)	Adsorção	Octyl-sepharose	189
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Adsorção	PEI-sepharose	202
	Lecitase (LL)	Adsorção		188
REICHARDT <i>et al.</i> (2018)	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Adsorção	PCM-01	8,6
		Covalente	PCM-01	22
		Adsorção	ReliZyme® HG403	4,5
		Covalente		33
WAN <i>et al.</i> (2018)	<i>Candida rugosa</i> com Ca ₃ (PO ₄) ₂	Adsorção	Resina Troca Iônica	3.176
CAI <i>et al.</i> (2018)	<i>Rhizopus Chinensis</i>	Covalente	Celulose bacteriana	ND
ZHANG <i>et al.</i> (2018)	<i>Candida rugosa</i>	Covalente	Sílica	33,6
JIN <i>et al.</i> (2018)	<i>Burkholderia Cepacia</i>	Adsorção	Sílica + R (alquil)	ND
URRUTIA <i>et al.</i> (2018)b	<i>Candida antarctica</i> (Cal-B)	Adsorção	Quitosana + R (alquil)	484
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção		884
MEHDI <i>et al.</i> (2018)	Girassol	Adsorção	Quitina	ND
		Iônica	DEAE-celulose D-E52	ND
		Covalente	Quitina	ND
BOLINA <i>et al.</i> (2018)	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Adsorção	Resina Troca Iônica + epoxi SiO ₂	357
XIE; HUANG (2018)	<i>Candida rugosa</i>	Covalente	Grafeno + Fe ₃ O ₄	ND
CUI <i>et al.</i> (2015)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Covalente	Epóxi/modificações	850
SARNO <i>et al.</i> (2017)	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Iônica	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	ND
GAO <i>et al.</i> (2018)	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Adsorção	TiO ₂ com modificações	6119
FERREIRA <i>et al.</i> (2018)	<i>Geotrichum candidum</i>	Covalente	MANAE-agarose	45,4
LISBOA <i>et al.</i> (2018)	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção	Aero gel + Líquido iônico	977
POPPE <i>et al.</i> (2013)	<i>Rhizomucor miehei</i>	Covalente	Immobead 150	ND

ND = Não Disponibilizada no Artigo

Fonte: O Autor.

O presente trabalho apresentou um rendimento de imobilização de 142% (Tabela 12) para uma espuma de poliuretano funcionalizada com glutaraldeído utilizando a lipase proveniente de *Aspergillus oryzae* com uma atividade do suporte de 809,7 U/g, resultado comparável a outros trabalhos listados na Tabela 20, demonstrando que este trabalho inovador

potencial para ser explorado em diversas campos do conhecimento enzimático.

Hamid e Palanisamy (1994) realizaram uma revisão das aplicações de lipases imobilizadas e a grande parte da utilização dos imobilizados estão com o processo de adsorção para os reatores de membrana, leitos fixos, batelada com agitação e reator CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor).

A inovação deste trabalho está na simplicidade do processo de obtenção do suporte funcionalizado já no momento de produção da espuma (glutaraldeído participando da polimerização). O suporte pode ser produzido no formato desejado, por causa da expansão da espuma, em reatores tubulares (PFR), CSTR com a espuma como se fosse um leito fixo e até mesmo em reatores batelada em que o suporte apresenta comportamento dinâmico de catálise heterogênea (FOGLER, 2009). Após a cura do suporte, ocorre a realização da ligação covalente nas condições otimizadas, reduzindo custos de processo enzimático, metodologia esta ainda não descrita na literatura, que é a produção e funcionalização do suporte *in situ* durante a reação do poliuretano.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos na avaliação das proporções dos monômeros para a elaboração do suporte do PU com funcionalização *in situ* de grupos carbonila com a adição de 4 volumes distintos (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL) de glutaraldeído 50% (m/v), o volume de polioliol (7,0 mL) e isocianato (3,0 mL) foi selecionado para a formação da espuma, pois apresenta uma estrutura polimérica homogênea, visivelmente com boa maleabilidade e distribuição dos poros.

Ao avaliar a lixiviação do glutaraldeído do suporte através dos testes de Felhing e COT, obtêm-se a otimização da adição de glutaraldeído 50% (m/v) ao meio reacional da formação do suporte de 1 mL, com isso o volume dos reagentes para a formação do suporte é de 7,0 mL de polioliol, 3,0 mL de isocianato e 1,0 mL de glutaraldeído 50% (m/v).

Para a otimização da produção do suporte foram produzidos de 4 maneiras distintas, sendo a formulação escolhida com base nos testes de lixiviação de glutaraldeído, de imobilização enzimática e atividade do suporte produzido. Foi escolhido o suporte com a atividade de 817 U/g e rendimento de imobilização igual a 142%, e, o volume de reagentes para a produção deste suporte foi de 7,0 mL de polioliol, 4,0 mL de isocianato, 1,0 mL de glutaraldeído 50% (m/v) e 1,0 mL de glicerina, com meio reacional acidificado com H₃PO₄.

Observou-se que a utilização de glicerina no suporte proporcionou melhor estrutura do suporte (sem apresentar colapso da espuma) e distribuição uniforme de poros, provavelmente pelo efeito de reticulação na espuma que este composto induz ao processo de polimerização.

Aumentando a quantidade de glutaraldeído incorporado ao meio reacional em conjunto com a acidificação do meio, observa-se um escurecimento do suporte tanto visualmente quanto com as medições colorimétricas, sugerindo que o mecanismo de ligação química entre o glutaraldeído e o suporte (EPU) se conduza de maneira análoga ao da Reação de Maillard, em que o glutaraldeído comporta-se como um açúcar redutor e a estrutura da espuma comportando como uma proteína.

Os parâmetros otimizados para a imobilização da lipase no suporte foi com pH igual a 10 e temperatura de 20°C, com 160 minutos de contato entre suporte e solução enzimática.

A metodologia de imobilização por ligação covalente demonstrou-se superior a da adsorção, com mais atividade no suporte para ligação covalente e comparáveis a outras metodologias, indicando-se ser uma promissora metodologia de imobilização enzimática pela

diversidade de trabalhos futuros que este processo pode gerar e sua simplicidade na formação do suporte.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- ✓ Avaliar o imobilizado enzimático para reações de produção de aromas e biodiesel.
- ✓ Estimar o efeito de solventes (metanol e acetato de etila) frente ao imobilizado.
- ✓ Medir estabilidade térmica (temperatura ambiente, refrigeração e congelamento) do imobilizado.
- ✓ Especificar a faixa de resistência térmica do imobilizado e sua cinética.
- ✓ Quantificar número de ciclos do imobilizado.
- ✓ Comparar a utilização de agentes redutores da ligação de Schiff para a atividade do suporte, a estabilidade térmica, resistência térmica e número de ciclos.
- ✓ Julgar o efeito da ativação enzimática em alta pressão (CO₂, GLP), sobre a atividade catalítica da enzima.
- ✓ Realizar testes de imobilização em série, com a troca de suporte após decorrido o tempo de contato (90 minutos) e avaliar quantas vezes pode-se utilizar a mesma solução para a imobilização por ligação covalente.
- ✓ Otimizar uso de ácido fosfórico (H₃PO₄) no processo de produção do suporte.
- ✓ Comparar o efeito da utilização de outros ácidos inorgânicos, tais como HCl e H₂SO₄ sobre a formação e atividade do suporte.
- ✓ Usar FTIR para avaliar se o glutaraldeído está quimicamente ligado à espuma pelo nitrogênio em reação semelhante ao de Maillard.
- ✓ Imobilizar em outros valores de pH (10, 11 e 12) e temperatura entre 10 e 20°C.
- ✓ Decidir se o suporte pode realizar a ligação covalente com a enzima com a mesma estando em meios reacionais biotecnológicos.
- ✓ Ampliar a escala da reação.
- ✓ Realizar a reação enzimática em um sistema de fluxo contínuo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABB EL ATY, A. A.; MOSTAFA, F. A.; HASSAN, M. E.; HAMED, E. E.; ESAWY, M. A. Covalent immobilization of *Alternaria tenuissima* KM651985 laccase and some applied aspects . **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 74-81, 2017.
- ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2170- 2179, 2008.
- AGRAWAL, A.; KAUR, R.; WALIA, R. S. PU foam derived from renewable sources: Perspective on properties enhancement: An overview. **European Polymer Journal**, v. 95, p. 255 - 274, 2017.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, n. 159, p. 52–67, 2015.
- ALLINGER, N.L. **Química orgânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1980.
- ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1-12, 2017.
- AMINE, A. et al. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 76, p.180–194, 2016.
- AMOAH, J.; HO, S-H.; HAMA, S.; YOSHIDA, A.; NAKANISHI, A.; HASUNUMA, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase . **Biochemical Engineering Journal**, n. 105, p. 10–15, 2016.
- ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185–1194, 2009.
- ANVISA. INFORME TÉCNICO 04/07. **Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde**, fundamentos para a utilização. 2007.
- ARPINGY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, p. 177–183, 1999.
- BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; BRASK, J.; MOHAMMADI, M. Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil. **Biochemical Engineering Journal**, n. 101, p.23–31 , 2015.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties . **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2433 - 2462, 2013.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2ª Ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1996.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUI SAN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNANDEZ-PREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 83-93, 2004.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; MUÑOZ, N.; SERRA, E. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, p. 13-20, 2007.

BLANCO, R.M.; GUI SÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohyde reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360–366, 1988.

BOLINA, I. C. A.; SALVIANO, A. B.; TARDIOLI, P. W.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO₂ with glycine to immobilize microbial lipase – Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2354 - 2365, 2018.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biociencia Industrial**. V. 1. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biociencia Industrial**. V. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BRADY D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1639-1650, 2009.

CAI, Q.; HU, C.; WANG, Q.; WANG, J.; PAN, H.; HU, Y.; RUAN C. Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized onto spherelike bacterial cellulose . **International Journal of Biological Macromolecules** , v. 109, p. 1174 - 1181, 2018.

CANGEMI, J. M.; dos SANTOS, A. M.; NETO, S. C. Poliuretano: De Travesseiros a Preservativos, um polímero versátil. **Revista Química Nova Escola**, n. 3, p. 159–164, 2009.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 9, p. 217-226, 2005.

CAO, L.; LANGEN, L. V.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 387-394, 2003.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. USO DE SÍLICAS MODIFICADAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES. **Química nova**, n. 3, p. 399–409, 2015.

CASTILO, E.; DOSSAT, V.; MARTY, A.; CONDORET, J. S.; COMBES, D. The role of silica in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. **Journal of the American Oil Chemists' Society** . , n. 2, p. 77–85, 1997.

CHEN, W.; di CARLO, C.; DEVERY, D.; MCGRATH, D. J.; MCHUGH, P. E., KLEINSTEINBERG, K.; JOCKENHOEVEL, S.; HENNINKA, W. E.; KOK, R. J. Fabrication and characterization of gefitinib-releasing polyurethane foam as a coating for drug-eluting stent in the treatment of bronchotracheal cancer. **International Journal of**

Pharmaceutics, v. 548, p. 803 - 811, 2018.

CHEN, Z.; WANG, Y.; LIU, W.; WANG, J.; CHEN, H. A novel cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of papain and neutrase-production, partial characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 95, p. 650-657, 2017.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects . **Biotechnology Advances** , n. 33, p. 1443–1454, 2015.

CIPOLATTI, E. P.; MORENO-PÉRES, S.; SOUZA, L. T. de A.; VALÉRIO, A.; GUISÁN, J. M.; de ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; NINOW, J. L.; de OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 163-169, 2015.

CLEMENTE, M.; ROCHA, R. J.; IHA, K.; ROCCO, J. A. F. F. DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA DE PRÉ-POLÍMEROS NA SÍNTESE DE POLIURETANOS EMPREGADOS EM COMBUSTÍVEIS SÓLIDOS . **Química Nova**. v. 37, p. 982-988, 2014.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A M.; DIAS, B. R. **Tecnologia enzimática. Petrópolis: EPUB**, 2008.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. da G.; CARVALHO, P. de O. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **BiotechnoJournal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 67, p. 163–171, 2010.

CORADI, M.; ZANETTI, M.; VALERIO, A.; OLIVEIRA, D.; SILVA, A.; SOUZA, S. M. A. G. U.; SOUZA, A. A. U. Production of antimicrobial textiles by cotton fabric functionalization and pectinolytic enzyme immobilization. **Materials Chemistry and Physics**, n. 208, p. 28–34, 2018.

CORNILLE, A.; AUVERGNE, R.; FIGOVSKY, O.; BOUTEVIN, B.; CAILLOL, S. A perspective approach to sustainable routes for non-isocyanate polyurethanes . **European Polymer Journal**, v. 87, p. 535 - 552, 2017.

CUI, C.; TAO, Y.; GE, C.; ZHEN, Y.; CHEN, B.; TAN, T. Synergistic effects of amine and protein modified epoxy-support on immobilized lipase activity . **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 51 - 57, 2015.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, n. 4, p. 623–630, 2004.

DALLAGO, R.M.; BUSTAMANTE-VARGAS, C.E.; de OLIVEIRA, D.; MIGNONI, M.L.; VENQUIARUTO, L.D.; VALDUGA, E., TONIAZZO, G. Synthesis of a hybrid polymer-inorganic biomimetic support incorporating in situ pectinase from *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1569-1577, 2015(b).

DALLAGO, R.M.; BUSTAMANTE-VARGAS, C.E.; de OLIVEIRA, D.; NYARI, N.L.D.; SOARES, M.B.A.; VALDUGA, E., BACKES, G.T. *In situ* immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 35-43, 2015(a).

DALLAGO, R.M.; SANTIN, C.M.T.; SCHERER, R.O.; NYARI, N.L.D.; DALLA ROSA, C.; de OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *candida antarctica* B immobilized in polyurethane foam.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, p. 90-94, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAS, R.; MISHRA, H.; SRIVASTAVA, A.; KAYASTHA, A. M. Covalent immobilization of β -amylase onto functionalized molybdenum sulfide nanosheets, its kinetics and stability studies: A gateway to boost enzyme application. **Chemical Engineering Journal** . v. 328, p. 215-227, 2017.

de ALBUQUERQUE, T.; PEIRCE, S.; RUEDA, N.; MARZOCHELLA, A.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**. v. 51, p.875-880, 2016.

de ALMEIDA, A. F.; TERRASAN, C. R. F.; TERRONE, C. C.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin . **Process Biochemistry**. v. 65, p. 71-80, 2018.

de ALMEIDA, V. V.; CANESIN, E. A.; SUZUKI, R. M.; PALIOTO, G. F. Análise Qualitativa de Proteínas em Alimentos Por Meio de Reação de Complexação do Íon Cúprico. **Química Nova na escola QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, n. 1, p. 34-40, 2013.

de CASTRO, H.F.; MENDES, A.A; dos SANTOS, J.C.; de AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

de LIMA, J. S.; CABRERA, M. P.; MOTTA, C. M. de S.; CONVERTIC, A.; JUNIOR, L. B. C. Hydrolysis of tannins by tannase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles coated with polyaniline. **Food Research International**. v. 107, p. 470-476, 2018.

de LIMA, I. N; ARAGON, C. C.; MATEO, C.; PALOMO, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment . **Process Biochemistry** . v. 48, p. 118-123, 2013.

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.

DHALIWAL, G. S.; ANANDAN, S.; CHANDRASHEKHAR, K.; LEES, J.; NAM, P. Development and characterization of polyurethane foams with substitution of polyether polyol with soy-based polyol . **European Polymer Journal** , v. 107, p. 105 - 117, 2018.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 1983-1991, 2009.

dos SANTOS, J. C. S.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes . **ChemCatChem** , v. 7, p. 2413 - 2432, 2015.

DU, Y.; GAO, J.; ZHOU, L.; MA, L.; HE, Y.; HUANG, Z.; JIANG, Y. Enzyme nanocapsules

armored by metal-organic frameworks: A novel approach for preparing nanobiocatalyst . **Chemical Engineering Journal**. v. 327, p. 1192-1197, 2017.

DUARTE, J. G.; LEONE-IGNACIO, K.; da SILVA, J. A. C.; FERNADEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography . **Fuel**. v. 177, p. 123-129, 2016.

EBRAHIMI, M., PLACIDO, L., ENGEL, L., ASHAGHI, K. S., CZERMAK, P. A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Desalination**, v. 250, p. 1105-1108, 2010.

EL-MASRY, M. M., DE MAIO, A., PORTACCIO, M., DI MARTINO, S., BENCIVENGA, U., ROSSI, S., GAETA, F. S., MITA, D. G. Isothermal and non- isothermal characterization of catalytic nylon membranes chemically grafted: dependence on the grafting percentage. **Enzyme and Microbial Technology** , v. 28, p. 773–784, 2001.

ELKAOUTIT, M.; NARANJO-RODRIGUEZ, I.; DOMÍNGUEZ, M.; HIDALGO-HIDALGO-DE-CISNEROS, J. L. Bio-functionalization of electro-synthesized polypyrrole surface by heme enzyme using a mixture of Nafion and glutaraldehyde as synergetic immobilization matrix: Conformational. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 24, p. 10926-10935, 2011.

EULÁLIO, H. Y. C.; CARDOSO, M. J. B.; MARINHO, T. M. A.; LIMA, R. J. S.; FOOK, M. V. L.; SWARNAKAR, R. Avaliação da imobilização da enzima urease extraída da semente de *Canavalia ensiformis* em membranas de quitosana, para uso em biossensores para detecção de uréia. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, n. 1, p. 34–39, 2016.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2011.

FERKL, P.; KRŠKOVÁ, I.; KOSEK, J. Evolution of mass distribution in walls of rigid polyurethane foams . **Chemical Engineering Science** , v. 176, p. 50 - 58, 2018.

FERNADEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 93, p. 185-197, 1998.

FERNANDES, P.; ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S. Desing and Characterisation of a Enzyme System for Inulin Hidrolysis. **Food Chemistry**. v. 95, p.77-82, 2006.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 62, p. 197-212, 2010.

FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 1, p. 243–252, 2012.

- FERREIRA, M. M.; SANTIAGO, F. L. B.; da SILVA, N. A. G.; LUIZ, J. H.H.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. HIRATA, D. B. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies . **Process Biochemistry** , v. 67, p. 55 - 63, 2018.
- FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.
- FURUYA, T.; KUROIWA, K.; KINO, K. Biotechnological production of vanillin using immobilized enzymes. **Journal of Biotechnology**, n. 243, p. 25–28, 2017.
- GAO, Z.; CHU, J.; JIAN, T.; XUD, T.; WUA, B.; HE, B. Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO₂: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis . **Process Biochemistry** , v. 64, p. 152 - 159, 2018.
- GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 14, p. 241–253, 2018.
- GHATTAS, N.; FILICE, M.; ABIDI, F.; GUIBAN, J. M.; SALAH, A. B. Purification and improvement of the functional properties of *Rhizopus oryzae* lipase using immobilization techniques . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** . v. 110, p. 111-116, 2014.
- GIRELLI, A. M.; SALVAGNIB, L.; TAROLA, A. M. Use of Lipase Immobilized on Cellulose Support for Cleaning Aged Oil Layers . **Journal of the Brazilian Chemical Society** . v. 23, p. 585-592, 2012.
- GONG, J.; WANG, F.; REN, Y.; LI, Z.; ZHANG, J.; LI, Q. Preparation of biomass pigments and dyeing based on bioconversion. **Journal of Cleaner Production**, n. 182, p. 301–312, 2018.
- GONZALES-GIL, L.; MARICIO-IGLESIAS, M.; SERRRANO, D.; LEMA, J. M.; CARBALLA, M. Role of methanogenesis on the biotransformation of organic micropollutants during anaerobic digestion. **Science of the Total Environment**, n. 622, p. 459–466, 2018.
- GRIGORAS, A. G. Catalase immobilization—A review . **Biochemical Engineering Journal** . v. 117, p. 1-20, 2017.
- GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBRŮS, M. Perspectives and applications of immobilized β -galactosidase in food industry – a review. **Czech Journal of Food Science**. n. 1, p. 1– 14, 2008.
- GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2–3, p. 137-143, 2010.
- GUISÁN, J. M. Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375–382, 1988.
- GUISÁN, J. M. et al. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press Inc. , 2006.
- GÜLEÇ, H. A. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: Effect of surface characteristics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 83-90, 2013.

- GUNCHEVA, M.; PAUNOVA, K.; DIMITROV, M.; YANCHEVA, D. Stabilization of *Candida rugosa* lipase on nanosized zirconia-based materials . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** . v. 108, p. 43-50, 2014.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 763–781, 2004.
- HALLING, P. J.; ULIJN, R. V.; FLITSCH, S. L. Understanding enzyme action on immobilised substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 136-142, 2005.
- HAMID, N. S. A.; PALANISAMY, U. D. M. IMMOBILIZED LIPASE SYSTEMS FOR MODIFICATION AND PROCESSING OF LIPIDS - A REVIEW . **Journal of Industrial Technology** , v. 4, p. 1 - 40, 1994.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, n. 27, p. 782–798, 2009.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–251, 2006.
- HEBEISH, A.; HASHEM, M.; SHAKER, N.; RAMADAN, M.; EL-SADEK, B.; HADY, M. A. Effect of post- and pre-crosslinking of cotton fabrics on the efficiency of biofinishing with cellulase enzyme . **Carbohydrate Polymers** . v. 78, p. 953-960, 2009.
- HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277-286, 2008.
- HOODA, P. V. A novel polyurethane/nano ZnO matrix for immobilization of chitinolytic enzymes and optical sensing of chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1173-1183, 2018.
- HU, Y.; DAI, L.; DU, W.; WANG, Y. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs). **Renewable and Sustainable Energy Reviews** , n. 91, p. 793–801, 2018.
- IONESCU, M.. **Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes**, 1 ed., Rapra Technology Limited: United Kingdom, 2005.
- IUPAC. **Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes (Technical Report)** International Union of Pure and Applied Chemistry. Plymouth, UK, p.597-600. 1995
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 13, p. 390– 397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, n. 16, p. 396–403, 1998.
- JAIN, R.; NAIK, S. N. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase in solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 15, p. 181–184, 2018.

- JAMWAL, S.; DHARELA, R.; GUPTA, R.; AHN, J-H.; GHANUHAN, G. S. Synthesis of crosslinked lipase aggregates and their use in the synthesis of aspirin . **Chemical Engineering Research and Design** , n. 97, p. 159–164, 2015.
- JANG, W-Y.; KRAYNIK, A. M.; KYRIAKIDES, S. On the microstructure of open-cell foams and its effect on elastic properties. **International Journal of Solids and Structures**. v. 45, p. 1845-1875, 2008.
- JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** , n. 66, p. 264–269, 2010.
- JIN, Q.; LI, X.; DENG, C.; ZHANG, Q.; YI, D.; WANG, X.; TANG, Y. Silica nanowires with tunable hydrophobicity for lipase immobilization and biocatalytic membrane assembly . **Journal of Colloid and Interface Science** , v. 531, p. 555 - 563, 2018.
- JOCHEMS, P., SATYAWALI, Y., ROY, S. V., DOYEN, W., DIELS, L., DEJONGHE, W. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 580-588, 2011.
- KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1–3, p. 157-176, 2000.
- KENNEDY, J. F.; KALOGERAKIS, B. Immobilization of glucoamylase on gelatin by transition-metal chelation. **BIOCHIMIE**. v. 62, p. 549-561, 1980.
- KIM, H.; CHOI, N.; OH, S . W.; KIM, Y.; KIM, B. H.; KIM, I. H. Synthesis of α -linolenic acid-rich triacylglycerol using a newly prepared immobilized lipase . **Food Chemistry**, n. 237, p. 654–658, 2017.
- KIRDI, R.; AKACHA, N. B.; BEJAOU, H.; MESSAOUDI, Y.; ROMANO, D.; MOLINARI, F.; GARGOURI, M. Mycelium-bound lipase from *Aspergillus oryzae* as efficient biocatalyst for cis-3-hexen-1-yl acetate synthesis in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 10, p. 13–19, 2017.
- KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, n. 30, p.269–278 , 2006.
- KOBAKHIDZE, A.; ELIASSHVILI, V.; CORVINI, P. F. X.; ČVANČAROVÁ, M. Biotransformation of ritalinic acid by laccase in the presence of mediator TEMPO. **New BIOTECHNOLOGY**, n. 43, p. 44–52, 2018.
- KRAITAPE; N.; THONGPIN, C. Influence of recycled polyurethane polyol on the properties of flexible polyurethane foams . **Energy Procedia** , v. 89, p. 186 - 197, 2016.
- KUMAR, S.; GUJJALA, L. K. S.; BANERJEE, R. Simultaneous pretreatment and saccharification of bamboo for biobutanol production. **Industrial Crops and Products**, n. 101, p. 21–28, 2017.
- LAMBRECHT, R. H. D.; SLEGGERS, G.; MANNENS, G.; CLAYES, A. Adsorption of charged substrates and products on an enzyme reactor prepared by glutaraldehyde coupling on alkylamine derivatives of Ti(IV)-coated porous silica beads. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 9, p. 225-228, 1987.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014.

LIM, C. L.; NOR, M. A.; KAMARUL, A. A. Cryogenic pipe flow simulation for liquid nitrogen with vacuum insulated pipe (VIP) and Polyurethane (PU) foam insulation under steady-state conditions . **Thermal Science and Engineering Progress** , v. 7, p. 302 - 310, 2018.

LISBOA, M. C.; RODRIGUES, C. A.; BARBOSA, A. S.; MATTEDI, S.; FREITAS, L. S.; MENDES, A. A.; DARIVA, C.; FRANCESCHIA, E.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. New perspectives on the modification of silica aerogel particles with ionic liquid used in lipase immobilization with platform in ethyl esters production . **Process Biochemistry** , v. 75, p. 157 - 165, 2018.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p.1–10, 2005.

MACARIO, A.; VERRI, F.; DIAZ, U.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Pure silica nanoparticles for liposome/lipase system encapsulation: Application in biodiesel production . **Catalysis Today**, v. 204, p. 148-155, 2013.

MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. N. Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of Cleaner Production**, n. 145, p. 114–133, 2017.

MANO, E. B. **POLÍMEROS COMO MATERIAIS DE ENGENHARIA**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1991.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **INTRODUÇÃO A POLÍMEROS**. 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1999.

MANOJ, D.; THEYAGARAJAN, K.; SARAVANAKUMAR, D.; SENTHIKUMAR, S.; THENMOZHI, K. Aldehyde functionalized ionic liquid on electrochemically reduced graphene oxide as a versatile platform for covalent immobilization of biomolecules and biosensing. **Biosensors and Bioelectronics** , n. 103, p. 104–112, 2018.

MARCONI, W. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive Polymers**, v. 11, p. 1-19, 1989.

MARPANI, F.; PINELO, M.; MEYER, A. S. Enzymatic conversion of CO₂ to CH₃OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems . **Biochemical Engineering Journal** , n. 127, p. 217–228, 2017.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J. M. Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy Supports for Stabilization of Industrial Enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 629–634, 2002.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology** , n. 40, p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, C. O. M.; HIDALGO,

- A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J. M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B. C. C.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, n. 4, p. 772–777, 2003.
- MEDHI, W. A.; MEHDE, A. A.; ÖZACAR, M.; ÖZACAR, Z. Characterization and immobilization of protease and lipase on chitin-starch material as a novel matrix . **International Journal of Biological Macromolecules** , v. 117, p. 947 - 958, 2018.
- MEHTA, J.; BHARDWAJ, N.; BHARDWAJ, S.; KIM, K-H.; DEEP, A. Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates . **Coordination Chemistry Reviews** . v. 322, p. 30-40, 2016.
- MENDES, A. A.; de OLIVEIRA, P. C.; de Castro, H. F.; GIORDANO, R. de L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; de CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 78, p. 119–134, 2012.
- MICHAELI, W.; GREIF, H.; KAUFMANN, H.; VOSSEBÜRGER, F. J. **TECNOLOGIA DOS PLÁSTICOS**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1995.
- MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; LAGE, F. A. P.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A.. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies . **Chemical Engineering Journal** . v. 251, p. 392-403, 2014.
- MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor . **Bioresource Technology** , n. 98, p. 1260–1264, 2007.
- MOHAMED, A., NEMESHWAREE, B., BRIGITTE, M., ANNE, P., KALIM, B., PASCAL, D., ANNE-SOPHIE, M., RÉNATO, F. Activity of enzymes immobilized on plasma treated polyester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 261-272, 2016.
- MONG THU, T. T.; KRASAEKOOPT, W. Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginosus* using alginate and different copolymer types . **Agriculture and Natural Resources** . v. 50, p. 155-161, 2016.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**. 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2007.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R; N. **Química Orgânica**. 16. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2011.
- MULDER, M. Basic **Principles of Membrane Technology**. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- NADAR, S. S.; RAO, P.; RATHOD, V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. **Food Research International**, n. 108, p. 309–330, 2018.
- NETO, S. A.; MINTEER, S. D.; ANDRADE, A. R. Developing ethanol bioanodes using a

hydrophobically modified linear polyethylenimine hydrogel for immobilizing an enzyme cascade. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 812, p. 153–158, 2018.

NICOLETTI, G. **IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE B DE *Candida antarctica* EM ESPUMA DE POLIURETANO E APLICAÇÃO NA SÍNTESE DO ÉSTER GERANIL PROPIONATO**, Florianópolis. 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis.

NORAINI, M Y.; ONG, H. C.; BADRUL, M. J.; CHONG, W. T. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 39, p. 24–34, 2014.

NOVOZYMES, 2018. **New enzyme technology converts waste oils into biodiesel**. Disponível em: ><https://www.novozymes.com/pt/news/news-archive/2014/12/new-enzyme-technology-converts-waste-oil-into-biodiesel><(acessado em Agosto de 2018) .

NYARI, N. L. D. **ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B EM POLIURETANO**, Rio Grande do Sul. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim.

NYARI, N. L. D.; FERNANES, I. A.; BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; STEFFENS, C.; de OLIVEIRA, D.; ZENI, J.; RIGO, E.; DALLAGO, R. M. *In situ* immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52-61, 2016.

OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Enzymatic esterification of ethanol by an immobilised *Rhizomucor miehei* lipase in a perforated rotating disc bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 26, p.446–450, 2000.

OURIQUE, P. A.; KRINDGES, I.; AGUZZOLI, C.; FIGUEROA, C. A.; AMALVY, J.; WANKE, C. H.; BIANCHI, O. Synthesis, properties, and applications of hybrid polyurethane–urea obtained from air-oxidized soybean oil. **Progress in Organic Coatings**, v. 108, p. 15-24, 2017.

PALAI, T., KUMAR, A., BHATTACHARYA, P. K. Enzyme immobilization/ bioconjugation in producing galactio-oligosaccharidies from lactose: developments of kinetic models and bio-reactors. **Materials Today: Proceedings** 3, p. 3568-3586, 2016.

PALAI, T., SINGH, A. K., BHATTACHARYA, P. K. Enzyme, β -galactosidase immobilized on membrane surface for galacto-oligosaccharides formation from lactose: Kinetic study with feed flow under recirculation loop. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 68-76, 2014.

PALLA, C. A.; PACHECO, C.; CARRÍN, M. E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization . **Biochemical Engineering Journal** , v. 55, p. 199-207, 2011.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties . **Enzyme and Microbial Technology** . v. 36, p. 447-454, 2005.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Novel enzymatic processes applied to the food industry . **Current Opinion in Food Science** , n. 7, p. 64–72, 2016.

- PENCREACH, G.; LEULLIER, M.; BARATTI, J., Proprieties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 181-189, 1997.
- POPPE, J. K.; COSTA, A. P. O.; BRASIL, M. C.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** , v. 94, p. 57 - 62, 2013.
- POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511-525, 2015 .
- QUILLES, J.C.J.; BRITO, R.R.; BORGES, J.P.; ARAGON, C.C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; GOMES, E.; da SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GUIBAN, J.M. Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents . **Biochemical Engineering Journal** , v. 93, p. 274 - 280, 2015.
- RAMIREZ, B. J.; GUPTA, V. High tear strength polyurea foams with low compression set and shrinkage properties at elevated temperatures . **International Journal of Mechanical Sciences** , v. 150, p. 29 - 34, 2019.
- REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**. V. 3. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária - UFPEL, 2000.
- REGULY, J.C. **Biotechnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos**. Pelotas: Ed. Universitaria UFPel, 1996. v.1
- REICHARDT, C.; UTGENANT, S.; STAHMANN, K-P.; KLEPEL, O.; BARIG, S. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material . **Biochemical Engineering Journal** , v. 138, p. 63 - 73, 2018.
- REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147-148, p.237-250, 2009.
- REMPEL, A.; MACHADO, T.; TREICHEL, H.; COLLA, E.; MARGARITES, A. C.; COLLA, L. M. Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amyolytic enzymes. **Bioresource Technology**, n. 263, p. 163–171, 2018.
- REZENDE, R.; SOCCOL, C.; FRANÇA, L.; FUENTES, A. **Biotechnologia aplicada à Agro&Indústria**. Fundamentos e Aplicações. V. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2016.
- RIOS, N.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; dos SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry** , v. 75, p. 99 - 120, 2018.
- RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization microbial of lipase on chitosan and agarose actived by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Capinas: Casa do Pão, 2005.
- ROKICKI, G.; PIOTROWSKA, A. A new route to polyurethanes from ethylene carbonate, diamines and diols. **Polymer**, n. 43, p.2927–2935, 2002.

- RUEDA, N.; dos SANTOS, C. S.; RODRIGUEZ, M. D.; ALBUQUERQUE, T. L.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** , n. 128, p. 10-18, 2016.
- RUSSELL, J.B. **Química Geral**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. v.1.
- SANTOS, J. C. S. D.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413-2432, 2015.
- SARNO, M.; IULIANO, M.; POLICHETTI, M.; CIAMBELLI, P. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles for banana flavour synthesis . **Process Biochemistry** , v. 56, p. 98 - 108, 2017.
- SCHULZE, T.; IAKOVLEVA, A.; CAO, Q.; CONRAD, S.; ZABELKINA, S.; GRACHEV, A. Polyurethane foams produced from pyrolysis oil – Production and possible application . **Biomass and Bioenergy** , v. 115, p. 195 - 202, 2018.
- SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDLE, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350–361, 2008.
- SHAHA, S. H.; RAJAA, I. A.; RIZWANB, M. R.; RASHIDC, N.; MAHMOODA, Q.; SHAHA, F. A.; PERVEZ, A. Potential of microalgal biodiesel production and its sustainability perspectives in Pakistan. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** , n. 81, p. 76–92, 2018.
- SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: A Review. **Biotechnology**, n.10, p.23–40, 2011 .
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.
- SHARMA, S. K.; LEBLANC, R. M. Biosensors based on β-galactosidase enzyme: Recent advances and perspectives. **Analytical Biochemistry**, n. 535, p.1–11, 2017.
- SHELDON, R. A.; van PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.
- SHELDON, R.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. Cross-Linked Enzyme Aggregates. In: GUIBAN, J. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**: Humana Press, v.22, 2006. cap. 3, p.31-45. (Methods in Biotechnology™). ISBN 978-1-58829- 290-2.
- SHEN, L.; CHENG, K. C. K.; SCHROEDER, M.; YANG, P.; MARSH, E. N. G.; LAHANN, J.; CHEN, Z. Immobilization of enzyme on a polymer surface . **Surface Science** , v. 648, p. 53-59, 2016.
- SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies . **Biochemical Engineering Journal** . v. 60, p. 16-24, 2012.
- SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. de O.;

- ROSA, C. D.; OLIVEIRA, D.; O. V.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 54-59, 2013.
- SIVARAMAKRISHNAN, R. ; INCHAROENSAKDI , A. Direct transesterification of *Botryococcus sp.* catalysed by immobilized lipase: Ultrasound treatment can reduce reaction time with high yield of methyl ester t . **Fuel**. v. 191, p. 363-370, 2017.
- SÓTI, V.; LENAERTS, S.; CORNET, I. Of enzyme use in cost-effective high solid simultaneous saccharification and fermentation processes. **Journal of Biotechnology**, n. 270, p. 70–76, 2018.
- SUN, S.; WANG, G.; WANG, P. A cleaner approach for biodegradable lubricants production by enzymatic glycerolysis of castor oil and kinetic analysis. **Journal of Cleaner Production**, n. 188, p. 530–535, 2018.
- TACIAS-PASCACIO, V. G.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, M.; YATES, M.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support . **Fuel** , v. 200, p. 1-10, 2017.
- TARDIOLI, P. W.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Hydrolyses of proteins by immobilized-stabilized Alcalase- glyoxilagarose. **Biotechnololy Progress**, v.19, p. 352–360, 2003.
- TRAN, C. T. H.; NOSWORTHY, N.; BILEK, M. M. M.; MCKENZIE, D. R. Covalent immobilization of enzymes and yeast: Towards a continuous simultaneous saccharification and fermentation process for cellulosic ethanol. **Biomass and Bioenergy**, n. 81, p. 234–241, 2015.
- URRUTIA, P.; BERNAL, C.; WILSON, L.; ILLANES, A. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 116, p. 182–193, 2018. (a)
- URRUTIA, P.; ARRIETA, R.; ALVAREZ, L.; CARDENAS, C.; MESA, M.; WILSON, L. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability . **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 674 - 686, 2018. (b)
- van DONKELAAR, L. H. G.; MOSTERT, J.; ZISOPOULOS, F. K.; BOOM, R. M.; GOOT, A. The use of enzymes for beer brewing: Thermodynamic comparison on resource use. **Energy**, n. 115, p. 519–527, 2016.
- VASILEVA, N., IOTOV, V., IVANOV, Y., GODJEVARGOVA, T., KOTIA, N. Immobilization of β -galactosidase on modified polypropilene membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p.710-719, 2012.
- VASILEVA, N., IVANOV, V., DAMYANOVA, S., KOSTOVA, I., GODJEVARGOVA, T. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 339-346, 2016.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32–38, 1997.

VILAR, W. D. **Química e Tecnologia dos Poliuretanos**, 2. ed., Rio de Janeiro: Vilar Consultoria, 1999.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica: estrutura e função**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

WAN, D.; TIANA, L.; LIA, X.; ZHANG, Q. A versatile strategy for enzyme immobilization: Fabricating lipase/inorganic hybrid nanostructures on macroporous resins with enhanced catalytic properties . **Biochemical Engineering Journal** , v. 139, p. 101 - 108, 2018.

WU, J. C. Y.; HUTCHINGS, C. H.; LINDSAY, M. J.; WERNER, C. J.; BUNDY, B. C. Enhanced Enzyme Stability Through Site-Directed Covalent Immobilization. **Journal of Biotechnology**, n. 193, p. 83–90, 2015.

XIE, W.; HUANG, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe₃O₄ nanocomposite: Characterization and application for biodiesel production . **Energy Conversion and Management** , v. 159, p. 42 - 53, 2018.

YAN, H-D.; ZHANG, Q.; WANG, Z. Biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters with high substrate loading by a whole-cell lipase from *Aspergillus oryzae*. **Catalysis Communications**, n. 45, p. 59–62, 2014.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

ZHANG, C.; DONG, X.; GUO, Z.; SUN, Y. Remarkably enhanced activity and substrate affinity of lipase covalently bonded on zwitterionic polymer-grafted silica nanoparticles . **Journal of Colloid and Interface Science** , v. 519, p. 145 - 153, 2018.

ZHANG, H.; FANG, W-Z.; LI, Y-M.; TAO, W-Q. Experimental study of the thermal conductivity of polyurethane foams. **Applied Thermal Engineering** , v. 115, p. 528 - 538, 2018.

ZHAO, K.; CAO, X.; DI, Q.; WANG, M.; CAO, H.; DENG, L.; LIU, J.; WANG, F.; TAN, T. Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase . **Renewable Energy** . v. 103, p. 383-387, 2017.

8 ANEXO

Anexo 1: Aplicações das Enzimas.

Enzima	Aplicação	Referência
Lipase	Biodiesel de algas	SHAHA <i>et al.</i> , 2018.
Lacase	Pigmentos de polifenóis	GONG <i>et al.</i> , 2018.
Dehidrogenase	Sensores	NETO <i>et al.</i> , 2018.
Lacase	Degradação do ácido ritalínico	KOBAKHIDZE <i>et al.</i> , 2018.
Alcalino pectinase	Tecido anti microbiano	CORADI <i>et al.</i> , 2018.
Dehidrogenase	Metanol de CO ₂	MARPANI <i>et al.</i> , 2017.
Peroxidase	Branqueamento tecidos	MADHU; CHAKRABORTY, 2017.
Galactosidase	Sensores	SHARMA; LEBLANC, 2017 .
Xinalase	Butanol de bambu	KUMAR <i>et al.</i> , 2017.
Lipase	Ácido linoleico	KIM <i>et al.</i> , 2017.
Oxigenase	Baunilha (aroma)	FURUYA <i>et al.</i> , 2017.
Pectinase	Clarificação de sucos	PATEL <i>et al.</i> , 2016.
Transglutaminase	Promover cross-link em proteínas	PATEL <i>et al.</i> , 2016.
Fitase	Digestibilidade de ração	PATEL <i>et al.</i> , 2016.
Invertase	Sensores	AMINE <i>et al.</i> , 2016.
Amilase	Cerveja (Redução Energia)	van DONKELARR <i>et al.</i> , 2016.
Urease	Sensores	EULÁLIO <i>et al.</i> , 2016.
Galactosidase	Produtos lácteos sem lactose	CHOI <i>et al.</i> , 2015.
Frutotransferase	Frutooligossacarídeos de sucrose e inulina	CHOI <i>et al.</i> , 2015.
Celulase e protease	Polimento de tecidos	CHOI <i>et al.</i> , 2015.
Xinalase e lignase	Branqueamento de papel	CHOI <i>et al.</i> , 2015.
Nitralase	Ácido Glicólico de Formaldeído e Ácido Cianídrico	CHOI <i>et al.</i> , 2015.
Nitrila Hidratase	Acrilamida de acrilonitrila	CHOI <i>et al.</i> , 2015.
Glicerol Deidratase	1,3 Propanodiol de Glicerol	CHOI <i>et al.</i> , 2015.
Lipase	Aspirina	JAMWAL <i>et al.</i> , 2015.
Celulase	Etanol de Segunda geração	TRAN <i>et al.</i> , 2015.
Lipase	Biodiesel com metanol	JI <i>et al.</i> , 2010.
Protease	Hidrólise de Proteínas	TARDIOLI <i>et al.</i> , 2003.

Anexo 2: Métodos de imobilização de enzimas.

Método	Enzima	Suporte	Referência
Ligação covalente	Glucose Oxidase	Líquido Iônico com glutaraldeído	MANOJ <i>et al.</i> , 2018
Ligação covalente	Tanase	Partículas Magnéticas com polianilina	de LIMA <i>et al.</i> , 2018
Adsorção	Lipase	Octil-agarose	de ALMEIDA <i>et al.</i> , 2018
Adsorção	Lipase	Poli (estireno divinibenzeno)	ALVES <i>et al.</i> , 2017
Encapsulamento	Catalase	Zinco (Zn-MOF)	DU <i>et al.</i> , 2017
Adsorção	Lipase	Celite	SIVARAMAKRISHNAN ; INCHAROENSAKDI , 2017
Ligação cruzada	Neutrase	Enzima + glutaraldeído	CHEN <i>et al.</i> , 2017
Encapsulamento	Lacase	Alginato	ABB EL ATY <i>et al.</i> , 2017
Ligação covalente	β -Amilase	Nanopartículas de sulfito de Molibidênio + glutaraldeído	DAS <i>et al.</i> , 2017
Adsorção + Encapsulamento	Lipase	Diatomita + Alginato	ZHAO <i>et al.</i> , 2017
Encapsulamento	Peroxidase	Cobre (Cu-MOF)	MEHTA <i>et al.</i> , 2016
Encapsulamento	Protease e Lipase	Alginato e outros copolímeros	MONG THU; KRASAEKOOPT, 2016
Ligação covalente	Celulase	Poliestireno com íons N (plasma)	TRAN <i>et al.</i> , 2015
Adsorção	Lipase	Óxidos de Zircônio	GUNCHEVA <i>et al.</i> , 2014
Adsorção	Lipase	PHB	MIRANDA <i>et al.</i> , 2014
Adsorção	Lipase	Sepabeads (C18)	GHATTAS <i>et al.</i> , 2014
Ligação covalente	Lipase	Glioxil-agarose	de LIMA <i>et al.</i> , 2013
Ligação covalente	Lipase	Celulose ativada com NaIO ₄	GIRELLI <i>et al.</i> , 2012
Ligação covalente	Lipase	Quitosana e quitosana-alginato	SILVA <i>et al.</i> , 2012
Ligação cruzada	Lipase	Enzima + glutaraldeído	FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010
Ligação cruzada	Celulase	Enzima + N,N-dimetilol 4,5-dihidroietileno urea	HEBEISH <i>et al.</i> , 2009
Adsorção	Lipase	Lipase/Glioxil-agarose	PALOMO <i>et al.</i> , 2005