

Bruno Ricardo Facin

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SUPORTE POLIMÉRICO E
APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr José Vladimir de Oliveira.

Coorientador : Dra. Aleksandra Valério.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Facin, Bruno Ricardo

Imobilização de lipase em suporte polimérico e aplicação na hidrólise de óleos vegetais. / Bruno Ricardo Facin ; orientador, José Vladimir de Oliveira ; coorientador, Alexsandra Valério – Florianópolis, SC, 2017.

92 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Lipase NS-40116. 3. Imobilização enzimática. 4. Espuma de poliuretano. 5. Hidrólise de óleos vegetais. I. De Oliveira, José Vladimir. II. Valério, Alexsandra. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Bruno Ricardo Facin

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SUPORTE POLIMÉRICO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 09 de Março de 2017.

Prof. Bruno Augusto Mattar Carciofi, Dr.
Coordenador do Curso

Prof. José Vladimir de Oliveira, Dr
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Alexsandra Valério, Dr.^a
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof.^a Mara Cristina Zenevicz, Dr.^a
Instituto Federal de Santa Catarina

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Josamaique Gilson Venerai, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus
queridos pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus. Também agradeço a todos que fizeram parte destes dois anos. Aos meus pais, Ivete e Itamar, e aos meus irmãos, Arthur e Júlia, por todo amor, carinho e apoio.

À minha companheira e namorada Marina, pela paciência e tolerância nos meses finais do mestrado, estando ao meu lado e me acompanhando na correria final.

Também deixo meus agradecimentos a todos os amigos conquistados nesta etapa: Eto, Zin, Shan, Dani, Vivi, Poloni, Mayer, Leno, Ale, e demais membros do LATESC, LCP e LABSEM.

Agradeço também ao Leandro da Central de Análises e a Maiara do LCME pelo apoio com as análises.

A todos os que de alguma maneira me auxiliaram durante a construção deste trabalho, e posso garantir que não foram poucas pessoas.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos por todos os recursos disponibilizados.

Ao Fundo de apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior (FUMDES) pelo apoio financeiro.

Por último deixo meu muito obrigado ao meu orientador Vladimir, e minha coorientadora Alexsandra, pela oportunidade e paciência. Obrigada também por me apoiarem na construção e elaboração desta dissertação e por estarem sempre dispostos a me auxiliar.

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca".

Dom Hélder Câmara

RESUMO

As lipases desempenham um papel muito importante nos processos tecnológicos em diversos segmentos industriais catalisando reações como hidrólise, esterificação e aminólise. A imobilização destas enzimas em suporte de baixo custo que permita aumentar sua estabilidade operacional e reutilização surge como uma grande vantagem econômica. Diante disso, esse trabalho explorou diferentes métodos de imobilização da lipase NS-40116 de *Thermomyces lanuginosus* em espuma flexível de poliuretano (PU) (adsorção física, ligação covalente/cruzada e aprisionamento *in situ*). A síntese do suporte polimérico foi realizada com poliol poliéter e tolueno diisocianato usando razão volumétrica de 5:3 (v/v). A caracterização dos imobilizados foi realizada por densidade aparente, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A atividade enzimática foi medida por hidrólise utilizando *p*-NPP (*p*-nitrofenil-palmitato) como substrato. Este imobilizado foi avaliado em termos de estabilidade ao pH (7,0 e 9,0), temperatura (24, 50 e 60 °C) e solvente (etanol e metanol) por 24 horas, além de estabilidade ao armazenamento (ambiente ou refrigerado) por 30 dias e determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$). Os resultados mostraram que após 30 dias de armazenamento o imobilizado apresentou apenas uma redução de 20% de atividade catalítica. A enzima livre e os imobilizados foram aplicados na hidrólise de óleo de soja. Os imobilizados foram avaliados em sucessivos ciclos de reuso sendo que a enzima imobilizada por aprisionamento *in situ* apresentou atividade catalítica acima de 50% após 5 ciclos de reuso, mostrando a eficiência do processo de imobilização.

Palavras-chave: Lipase NS-40116. Imobilização enzimática. Espuma de poliuretano. Reuso. Hidrólise de óleos vegetais.

ABSTRACT

Lipases play a very important role in the technological processes in a range of industrial process, catalyzing reactions like hydrolysis, esterification and aminolysis. Enzyme immobilization using a low-cost support that allows to increase operational stability and reutilization arises a great economic advantage. In this way, this work explored different methods of *Thermomyces lanuginosus* lipase NS-40116 immobilization in flexible polyurethane foam (PU) (physical adsorption, covalent/crosslinking and entrapment). The synthesis of polymer was carried out with polyol polyether and toluene diisocyanate (TDI) by using volumetric ratio of 5:3 (v/v). PU support before and after immobilization process was characterized by apparent density, scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The enzymatic activity was measured by hydrolysis using p-NPP (p-nitrophenyl palmitate) as substrate. Also, PU support containing immobilized enzyme was evaluated in terms of stability at pH (7.0 and 9.0), temperature (24, 50 and 60 °C) and solvent (ethanol and methanol) for 24 hours, and storage stability (ambient or refrigerated) for 30 days. The results showed that after 30 days of storage the immobilized showed only a reduction of 20% of catalytic activity. Free and immobilized enzyme were compared in the hydrolysis of soybean oil, and immobilized enzyme by entrapment was evaluated in successive cycles of reuse showing a catalytic activity above 50% after 5 successive cycles of reuse, showing the immobilization process efficiency.

Keywords: NS-40116 lipase. Immobilization. Polyurethane foam. Reuse. Vegetable oils hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de atuação das lipases.....	31
Figura 2 – Reações catalisadas por lipases.....	32
Figura 3 – Métodos para imobilização de enzimas.	34
Figura 4 – Formação da rede de polidopamina.	36
Figura 5 – Reações de formação da espuma de poliuretano.....	38
Figura 6 – Estrutura da espuma de PU: uma célula, as bordas de Plateau e as respectivas áreas transversais.	40
Figura 7 – Fluxograma das atividades desenvolvidas.	45
Figura 8 – Espuma de poliuretano (PU) (a) crescimento da espuma de poliuretano – (b) espuma de poliuretano cortada em cubos com 5 mm de lado.	46
Figura 9 – Atividade residual em <i>p</i> -NPP do suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por ligação covalente/cruzada.	56
Figura 10 – Atividade residual em <i>p</i> -NPP da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento <i>in situ</i> . Imagem canto inferior direito: estrutura do suporte de PU com NS-40116 imobilizada.	58
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura do suporte de PU (a) e (b), suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por ligação química (c) e (d) e suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por aprisionamento <i>in situ</i> (e) e (f).	62
Figura 12 – Espectro de FTIR obtido para as etapas envolvidas na síntese de suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por ligação química.	63
Figura 13 – Espectro de FTIR obtido para o suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por aprisionamento <i>in situ</i>	64
Figura 14 – Teores de acidez obtidos a partir da hidrólise do óleo de soja.	65
Figura 15 – Estabilidade térmica da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento <i>in situ</i>	68
Figura 16 – Efeito do pH na atividade da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento <i>in situ</i> . .	69
Figura 17 – Estabilidade ao pH da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento <i>in situ</i>	70
Figura 18 – Estabilidade ao solvente da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento <i>in situ</i> . .	71
Figura 19 – Estabilidade ao armazenamento da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU <i>in situ</i>	73

Figura 20 – Avaliação dos sucessivos ciclos de reuso da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico por ligação química.	74
Figura 21 – Avaliação dos sucessivos ciclos de reuso da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento <i>in situ</i>	75
Figura 22 – Morfologia do suporte polimérico de PU com enzima NS-40116 imobilizada após os ciclos de reuso em hidrólise do óleo de soja: (a) e (b) imobilizada por ligação química, e (c) e (d) imobilizada por aprisionamento <i>in situ</i>	76
Figura 23 – Espectro de FTIR obtido para o suporte polimérico de PU com enzima NS-40116 imobilizada por ligação química e aprisionamento <i>in situ</i> após a aplicação na hidrólise do óleo de soja. (*) Após reuso na hidrólise em óleo de soja.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicação de espumas de PU como suporte para imobilização enzimática.	40
Tabela 2 - Reagentes utilizados.....	43
Tabela 3 – Concentração de enzima NS-40116 nos suportes poliméricos de PU.	59
Tabela 4 – Densidade aparente dos suportes poliméricos de PU.	60
Tabela 5 – Constantes cinéticas em <i>p</i> -NPP da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento <i>in situ</i> ..	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Atividade relativa
CO ₂	Dióxido de carbono
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HCl	Ácido Clorídrico
K _m	Constante de Michaelis–Menten
KOH	Hidróxido de Potássio
kV	Kilovoltz
LABSEM	Laboratório de Separação por Membranas
LATESC	Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LCP	Laboratório de Controle dos Processos
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
NaOH	Hidróxido de Sódio
PDA	Polidopamina
pH	Potencial hidrogeniônico (-log [H ⁺])
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
PU	Poliuretano
rpm	Rotação por minuto
TDI	Tolueno diisocianato
torr	Unidade de pressão
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
V _{máx}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	26
1.1.1 Objetivo Geral	26
1.1.2 Objetivos Específicos.....	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 ENZIMAS	29
2.1.1 Lipases.....	30
2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	33
2.2.1 Adsorção.....	34
2.2.2 Ligação covalente ou ligação cruzada.....	35
2.2.3 Aprisionamento <i>in situ</i>	36
2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	36
2.3.1 Poliuretano.....	37
2.4 HIDRÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS	41
2.5 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 MATERIAIS	43
3.1.1 Suporte	43
3.1.2. Biocatalisador	43
3.1.3 Reagentes	43
3.2 MÉTODOS	45
3.2.1 Fluxograma Das Atividades Desenvolvidas	45
3.2.2 Síntese do suporte polimérico.....	46
3.2.3 Diálise e liofilização da Enzima NS-40116.....	47
3.2.4 Imobilização da NS-40116	47
3.2.4.1 Adsorção	47
3.2.4.2 Ligação covalente/cruzada	47
3.2.4.3 Aprisionamento <i>in situ</i>	48
3.2.5 Determinação da Atividade de Hidrólise de <i>p</i> -NPP	48
3.2.6 Cálculo de rendimento de imobilização.....	49
3.2.7 Determinação do teor de proteína.....	49

3.2.8 Caracterização estrutural do suporte e enzima imobilizada	49
3.2.8.1 Densidade aparente	49
3.2.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	50
3.2.8.3 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	50
3.2.9 Hidrólise do óleo de soja	50
3.2.10 Determinação da capacidade de reuso	51
3.2.11 Determinação das constantes cinéticas.....	51
3.2.12 Avaliação da estabilidade à temperatura, pH, solvente e condições de armazenamento	51
3.2.12.1 Estabilidade à temperatura	52
3.2.12.2 Efeito e estabilidade ao pH	52
3.2.12.3 Estabilidade ao solvente.....	52
3.2.12.4 Estabilidade ao armazenamento	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 IMOBILIZAÇÃO DA NS-40116	55
4.1.1 Adsorção	55
4.1.2 Ligação covalente/cruzada	55
4.1.3 Aprisionamento <i>in situ</i>.....	57
4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO SUPORTE POLIMÉRICO	59
4.3 HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA	64
4.4 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS	66
4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE À TEMPERATURA, PH, SOLVENTE E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	67
4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE REUSO	73
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
5.1 CONCLUSÕES	79
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM SUPORTE POLIMÉRICO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS

Por que?

- Enzimas imobilizadas têm grande importância para processos industriais,
- As espumas de poliuretano são suportes baratos para a imobilização da lipase NS-40116;
- Hidrólise de óleos vegetais resulta em ácidos graxos livre que são de grande valia para diversos setores industriais.

Quem já fez?

- Não foram encontrados relatos na literatura de estudos sobre a imobilização da lipase NS-40116;
- Existem poucos relatos de imobilização de enzimas em espumas de poliuretano.

Hipóteses?

- A imobilização da lipase NS-40116 em suporte polimérico de poliuretano pode ser realizado com eficiência?
- De que forma o processo de imobilização interfere nas propriedades do imobilizado?
- É possível aplicar o imobilizado em reações de interesse industrial?

Como fazer?

- Aplicar diferentes técnicas de imobilização;
- Utilizar diferentes concentrações de lipase NS-40116 nos métodos de imobilização;
- Analisar as características do suporte polimérico por MEV e FTIR;
- Avaliar a estabilidade do imobilizado quanto ao pH, temperatura, solvente e condições de armazenamento.

Respostas

- Determinar qual método de imobilização permitiu um melhor rendimento em termos de atividade catalítica da enzima;
- Analisar qual método permitiu uma interação mais forte entre enzima e suporte permitindo maior quantidade de ciclos de reuso;
- Conhecer os parâmetros de estabilidade da lipase NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU;
- Avaliar a melhor condição e período de armazenamento do imobilizado.

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com questões de ordem ambiental bem como a busca pela redução de custos nos processos industriais sem perda na qualidade do produto final abriram espaço para a inserção das enzimas como catalisadores alternativos aos processos químicos convencionais. As enzimas são substâncias orgânicas de natureza proteica ou, em alguns casos, glicoproteica que atuam reduzindo a energia de ativação para que as reações bioquímicas ocorram sem alterar o seu equilíbrio, já que não são consumidas no processo. O uso destes biocatalisadores apresenta uma série de vantagens, como o emprego de condições mais brandas de processo, compatibilidade com substratos sintéticos e grande seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam. (PAQUES; MACEDO, 2006; LEHNINGER et al., 2002; ZENEVICZ, 2015; SANTOS, 2016).

Atualmente, diversas pesquisas vêm sendo direcionadas para a tecnologia de modificação de óleos e gorduras. A hidrólise enzimática de óleos vegetais irá produzir ácidos graxos, os quais encontram várias aplicações industriais, tais como fabricação de sabões, agentes tensoativos e detergentes, além da indústria alimentícia. Como os óleos são substratos muito heterogêneos, a alta especificidade e seletividade das lipases que serão utilizadas na reação de hidrólise vai resultar em produtos de melhor qualidade (GUTIÉRREZ-AYESTA et al., 2007).

As lipases são as enzimas mais utilizadas na síntese orgânica, sendo aplicadas em inúmeras preparações comerciais, devido a sua ampla especificidade e disponibilidade, maior estabilidade e baixo custo. Ressalta-se ainda, a capacidade das lipases em catalisar reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado, resultando em amplo potencial de aplicação. Sendo assim, as lipases vêm conquistando uma faixa cada vez maior do mercado focado principalmente na síntese de bioprodutos, seja nas áreas alimentícia, farmacêutica, química, cosmética, agricultura, têxtil, ambiental, biocombustíveis ou bioenergética (CASTRO et al., 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012; KRIEGER et al., 2004).

A NS-40116 é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificado, ainda não disponível para comercialização. Segundo o fabricante, a NS-40116 é uma nova enzima de baixo custo, em relação às enzimas comerciais, com especificidade para matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres (FFA), que podem ser usadas em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (PRICE et al., 2016; SANTOS, 2016; SILVA et al., 2016).

Contudo, sabe-se que não somente as lipases, mas todas as enzimas estão sujeitas à inativação seja por fatores químicos, físicos ou biológicos, seja durante o uso ou quando estocadas. Diante disso novas técnicas de imobilização e suportes poliméricos têm sido utilizadas no intuito de favorecer a estabilidade enzimática, garantir uma catálise eficiente e facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador, gerando vantagens econômicas (DALLA VECCHIA, 2004).

Dentre as técnicas utilizadas na imobilização de lipases, pode-se citar adsorção (CHEN et al., 2008), ligação covalente (MENG et al., 2014), e aprisionamento *in situ* (KOVALENKO et al., 2013), sendo que todas compartilham o mesmo objetivo, facilitar a separação do produto final, proporcionar a reutilização da enzima e, principalmente, garantir que o biocatalisador não tenha sua atividade e estabilidade afetadas durante o processo em comparação à sua forma livre (DALLA VECCHIA, 2004, BARBOSA et al., 2014).

Nesse sentido, poliuretanos (PU) são considerados uma classe promissora de polímeros no uso como suportes para imobilização de enzimas, considerando que estes possuem atrativas propriedades como resistência mecânica e a solvente, além de propriedades como durabilidade e baixo custo (ZANETTI-RAMOS et al., 2006; ZANETTI-RAMOS et al., 2008; GUNCHEVA et al., 2011; VALÉRIO; ARAÚJO; SAYER, 2013; VALÉRIO et al., 2014; CIPOLATTI et al., 2015b).

Apesar de a literatura já apresentar alguns estudos referente à imobilização de biocatalisadores em suporte polimérico de poliuretano, não foram encontrados estudos com relação à imobilização da lipase NS-40116 tanto neste tipo de suporte como em qualquer outro. Este trabalho traz também um comparativo entre diversas técnicas de imobilização enzimática com a finalidade de escolher um método que apresente rendimento elevado, alta estabilidade, resistência a diferentes condições de processo e que possibilite sua reutilização por vários ciclos na hidrólise de óleo de soja.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi imobilizar a lipase NS-40116 em espuma flexível de poliuretano (PU) por diferentes métodos de imobilização a fim de posterior aplicação na hidrólise de óleo de soja.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Imobilizar a lipase NS-40116 em espuma flexível de poliuretano por diferentes métodos de interação enzima-suporte: adsorção, ligação covalente/cruzada e aprisionamento *in situ*.

- Avaliar a atividade enzimática do biocatalisador nos imobilizados e selecionar as melhores técnicas e condições para caracterização estrutural e aplicação na hidrólise de óleo de soja;

- Caracterizar os suportes poliméricos de poliuretano com enzima imobilizada;

- Avaliar a eficiência da enzima imobilizada em suporte polimérico de poliuretano na hidrólise de óleo de soja;

- Avaliar o reuso da enzima imobilizada em suporte polimérico de poliuretano na hidrólise de óleo de soja;

- Avaliar os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada em suporte polimérico de poliuretano;

- Estudar a estabilidade das enzimas imobilizadas em suporte polimérico de poliuretano quanto a estabilidade ao pH, temperatura, solvente e condição de armazenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados assuntos encontrados na literatura relativos ao tema. O texto está estruturado basicamente em uma breve revisão acerca de enzimas, com ênfase nas lipases, seguida pelos principais métodos utilizados para a imobilização enzimática, e por fim, a apresentação do suporte polimérico utilizado neste trabalho juntamente com algumas aplicações industriais deste suporte com lipase imobilizada.

2.1 ENZIMAS

As enzimas são substâncias orgânicas de natureza proteica ou, em alguns casos, glicoproteica. Elas atuam reduzindo a energia de ativação para que as reações bioquímicas ocorram sem alterar o seu equilíbrio, já que não são consumidas no processo. Esta função coloca as enzimas como catalisadores biológicos, visto que, são capazes de acelerar ou mesmo promover reações bioquímicas de substratos em produtos que provavelmente não aconteceriam ou seriam excessivamente lentas sem a sua presença (LEHNINGER et al., 2002).

As enzimas podem ter origem animal, vegetal ou microbiana. Dentre a classe das lipases (serão abordadas detalhadamente no item 2.1.1), que, segundo a literatura, representam cerca de 35% dos processos bioquímicos atuais, a preferência do ponto de vista econômico e industrial é pelas fontes microbianas devido ao custo relativo ao seu isolamento (DALLA VECCHIA, 2004; PAQUES; MACEDO, 2006).

Os biocatalisadores vêm ganhando espaço na química orgânica como uma alternativa aos processos químicos convencionais por apresentarem uma série de vantagens, como o emprego de condições mais brandas de processo, compatibilidade com substratos sintéticos, catalise, em alguns casos, de reações nos dois sentidos, além de mostrarem uma grande seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam. Tais fatores impulsionaram a produção e comercialização de enzimas em geral, de modo que novas aplicações no setor industrial surgem exigindo do próprio setor um fluxo contínuo de produtos inovadores (PAQUES; MACEDO, 2006).

O alto custo das enzimas foi considerado durante muito tempo como um empecilho ao seu emprego nos processos comerciais, mesmo com seus aspectos tecnológicos conhecidos e aprovados. Estes catalisadores, não eram viáveis economicamente ou não tinham condições de competir com os produtos sintéticos. Cenário este, que

continuamente veio se desfigurando e hoje nos mostra outro panorama devido às inúmeras e incessáveis pesquisas desenvolvidas com esse intuito nos últimos anos (SANTOS, 2016).

As enzimas podem ser classificadas em seis grupos: oxidoreduções, transferases, liases, isomerases, ligases e hidrolases. Na química orgânica as mais investigadas são as hidrolases tais como as proteases, celulasas, amilases e lipases. Dentre as várias razões que tornam esta classe particularmente atrativa estão a ampla disponibilidade, o baixo custo, as condições suaves de síntese, a elevada especificidade para substratos e a não necessidade de uso de cofatores. Uma atenção especial é dada para as lipases, que são utilizadas para a hidrólise de ésteres graxos na natureza além de atuarem em reações de policondensação e politransesterificação, polimerizações de abertura do anel e reações de modificação de polímeros (DALLA VECCHIA, 2004; GEUS, 2007).

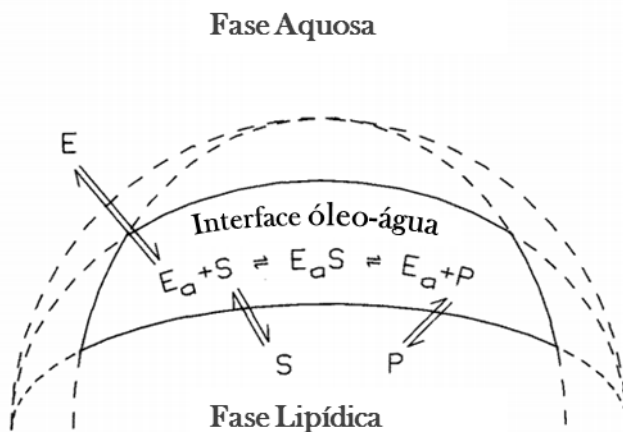
2.1.1 Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (ALVAREZ-MACARIE, et al., 1999; CARVALHO et al., 2003; BARBOSA et al., 2014; CIPOLATTI, 2015).

As lipases apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Esta definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros lipídeos (acilidrolases, colesteroesterase, tioesterases e outras). Uma representação do mecanismo de atuação das lipases esta enfatizado na Figura 1 (BROCKMAN, et al., 1988).

Um aspecto estrutural em específico das lipases merece destaque: a presença de uma tampa ou válvula que cobre o sítio ativo da enzima. Quando ocorre a ligação do substrato na superfície da enzima esta tampa move-se mudando a forma da enzima de fechada para aberta e permitindo o acesso ao seu sítio ativo. Além disso, neste momento uma larga superfície hidrofóbica fica exposta facilitando a ligação da lipase à interface (PAIVA et al., 2000; EMSLEY, 2001).

Figura 1 – Mecanismo de atuação das lipases.

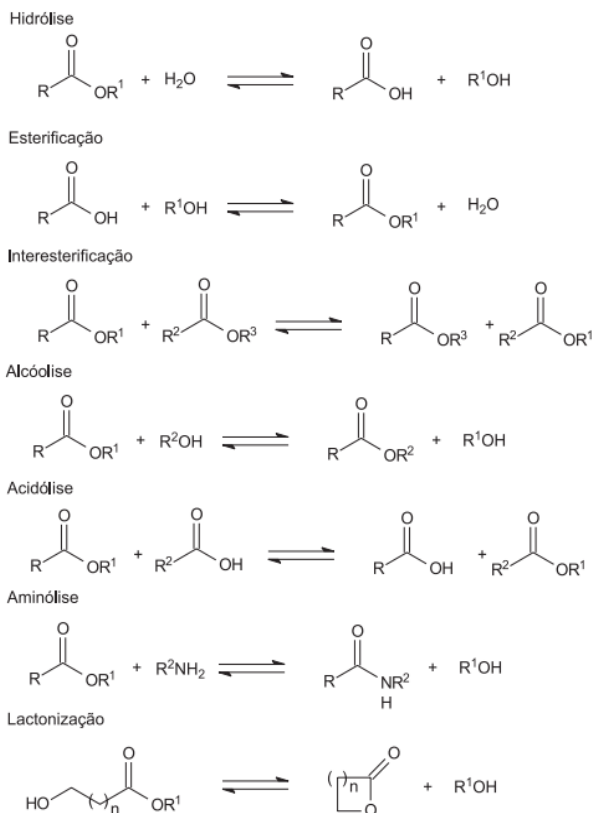


Fonte: adaptado de BROCKMAN et al. (1988).

As lipases também são capazes de catalisar reações reversas, assim, dependendo do substrato da reação, esta também pode ser chamada de reação de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise. A Figura 2 ilustra as principais reações catalisadas por lipases. (FURIGO, 2001; SHARMA et al., 2001; JAEGER et al., 2002; KAMBOUROVA et al., 2003; SAXENA et al., 1999; HASAN et al., 2006; PAQUES, 2006, MARTINS, et al., 2008; MACHADO, 2011;).

Em relação à especificidade ao substrato, as lipases são divididas em quatro grupos: o primeiro com as não específicas, que promovem a quebra do triacilglicerol em qualquer posição, formando os ácidos graxos e o glicerol de maneira aleatória; o segundo com as regioespecíficas, que liberam os ácidos graxos de algumas posições singulares do triacilglicerol; o terceiro com as estereoespecíficas, que formam apenas tipos únicos de estereoisômeros; e o quarto grupo, mais específico, realiza apenas a liberação de um determinado tipo de ácido graxo (MACRAE, 1983; FREITAS et al., 2008).

Figura 2 – Reações catalisadas por lipases.



Fonte: PAQUES; MACEDO (2006).

O grande número de aplicações das lipases na síntese orgânica é atribuído principalmente à alta disponibilidade e o baixo custo. Além disso, essas enzimas não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH extensa, são muito estáveis, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade, e podem catalisar uma série de reações. O deslocamento do equilíbrio da reação, sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), pode ser controlado facilmente pela quantidade de água presente no meio reacional (DALLA VECCHIA, 2004).

A utilização crescente desses biocatalisadores em diferentes tipos de bioprocessos é notável e um dos setores responsáveis por sua consolidação é o de síntese de bioprodutos, seja nas áreas alimentícia, farmacêutica, química, agricultura, têxtil, ambiental, biocombustíveis ou bioenergética, como apresentado na Tabela 1 do item 2.3.1. Tal efeito vem fazendo com que muitas empresas aprimorem suas pesquisas no desenvolvimento tanto de processos e produtos gerados a partir dos mesmos, como em pesquisas para novas soluções enzimáticas que visam o atendimento de novos setores e indústrias. (LEHNINGER et al., 2002; SIENIAWSKA, 2015; DALLA VECCHIA et al., 2004; CASTRO et al., 2004; BRIGIDA, 2006; HASAN et al., 2009; KAPOOR E GUPTA, 2012).

A lipase NS-40116 é uma formulação líquida produzida a partir do cultivo do microrganismo *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificado. Ainda não existem dados disponíveis sobre suas características, porém, podem assemelhar-se dos conhecidos para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* convencional. Segundo Kumar et al. (2015), esta hidrolase consiste de 269 resíduos de aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 29 kDa. Apresenta pH ótimo entre 11-12 e seu sítio ativo é composto pela tríade catalítica Ser-Asp-His (PRICE et al., 2016).

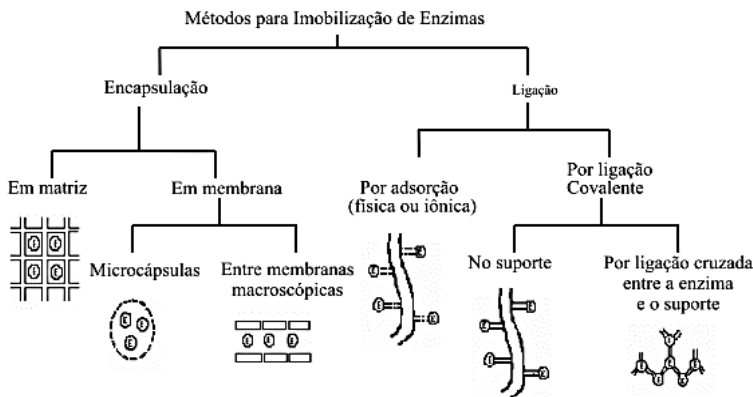
Um fato conhecido é que não somente as lipases, mas todas as enzimas estão sujeitas à inativação seja por fatores químicos, físicos ou biológicos, seja ainda, durante o uso ou quando estocadas. Diante disso, muitas e novas técnicas de imobilização têm sido utilizadas no intuito de favorecer a estabilidade enzimática, garantir uma catálise eficiente e facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador. O emprego destas técnicas tem sido crescente nos últimos vinte anos e permite que novas informações teóricas e aplicações práticas surjam a cada dia. Em escala industrial, o uso de biocatalisadores imobilizados apresenta a mesma tendência especialmente nos setores farmacêutico, de detergentes, couros e panificação (DALLA VECCHIA, 2004).

2.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As diferentes técnicas e métodos de imobilização enzimática, representados na Figura 3, apresentam em comum alguns anseios como facilitar a separação do produto final, proporcionar a reutilização da enzima e, principalmente, garantir um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo em comparação à sua forma livre. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais

ou modificações no sítio ativo da enzima. Porém, não existe uma regra que prediga a manutenção dos parâmetros enzimáticos após o processo de imobilização, ou seja, cada binômio enzima/método pode apresentar um comportamento distinto (DALLA VECCHIA, 2004, BARBOSA et al, 2014).

Figura 3 – Métodos para imobilização de enzimas.



Fonte: BUNGAY (2003), apud DALLA VECCHIA et al. (2004).

A seguir, serão abordadas as técnicas de imobilização utilizadas para a realização deste trabalho.

2.2.1 Adsorção

Neste método, a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha do mais adequado depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (VILLENEUVE et al., 2000; AHMAD; SARDAR, 2015).

De uma forma geral, o sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que normalmente se dá na superfície, depende do tamanho da proteína a ser adsorvida, da área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros do

suporte. Além disso, a concentração de enzima no meio também influencia diretamente neste processo, uma vez que a quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas seguindo as equações de Langmuir ou Freundlich (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA VECCHIA, 2004).

2.2.2 Ligação covalente ou ligação cruzada

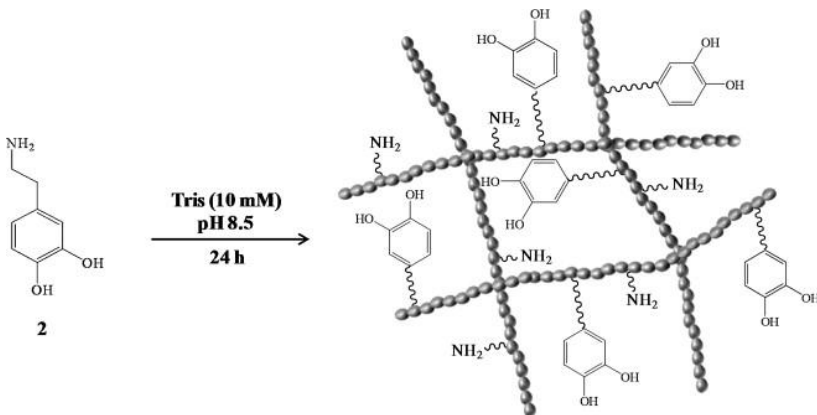
Este método envolve a modificação química de um aminoácido por meio da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água ou com a matriz, ou ainda pela formação de ligações cruzadas numa matriz contendo enzima (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA VECCHIA, 2004; AHMAD; SARDAR, 2015).

Esta técnica de imobilização não é tão comum quanto a adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção e conferir maior estabilidade e resistência a condições extremas de pH e temperatura. A principal preocupação é realizar a ligação covalente em aminoácidos que não sejam cruciais para a cadeia catalítica. O que pode ser difícil de conseguir e, normalmente, as enzimas imobilizadas com esta técnica perdem uma parte da sua atividade inicial (VILLENEUVE et al., 2000).

Muitos são os suportes que podem ser utilizados para este método, tanto orgânicos quanto inorgânicos, porém antes do processo de imobilização estes devem ser ativados. Esta ativação corresponde à incorporação de um grupo químico capaz de reagir com os grupos laterais da enzima, sendo o mais comum o glutaraldeído. Este composto polimeriza-se facilmente resultando em polímeros contendo funções aldeído insaturadas que podem reagir com grupos amino do suporte. (VILLENEUVE et al., 2000).

Segundo o trabalho de Lee et al. (2007), a polidopamina (PDA) é um material de revestimento que pode ligar-se praticamente a todos os tipos de suportes inorgânicos e orgânicos. Além dessas fortes propriedades de aderência, outra característica valiosa é a presença de grupos funcionais catecol e amina (Figura 4) que podem servir tanto para modificação covalente com moléculas selecionadas quanto para o carregamento de íons metálicos (FAURE et al., 2013; PARDIEU et al., 2016; LEFEBVRE et al., 2017).

Figura 4 – Formação da rede de polidopamina.



Fonte: adaptado de LEE et al. (2007), apud FAURE et al. (2013).

2.2.3 Aprisionamento *in situ*

Outra técnica de imobilização física de lipases é a inclusão em polímero insolúvel ou em microcápsula. A lipase é adicionada a fase monomérica, a qual, após polimerização, conduz ao seu aprisionamento. A principal vantagem deste método de imobilização é a não interação enzima-polímero e desta forma a desativação da enzima é geralmente evitada. Contudo, os fenômenos de transferência de massa em torno da membrana do polímero podem ser uma desvantagem. A taxa de difusão do substrato e do produto é frequentemente o parâmetro limitante e, geralmente, são necessárias concentrações de substrato elevadas para minimizar a sua influência (VILLENEUVE et al., 2000).

Sendo assim, pode-se afirmar que a escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende essencialmente das características da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada. Porém, apesar de muita discussão sobre o assunto, não existe ainda um suporte ideal que permita a obtenção de um biocatalisador eficiente, de baixo custo e síntese simples (LIMA et al., 2001; CIPOLATTI, 2016).

2.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Como já mencionado, não existe um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, porém existem algumas características

desejáveis comuns para sua aplicação na imobilização de enzimas. Entre elas inclui-se: alta afinidade para proteínas, presença de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e para modificações químicas, hidrofiliçidade, estabilidade mecânica, regenerabilidade, além de impor a menor quantidade de limitações para a ocorrência da reação (MATEO et al., 2007; SILVA, 2007; FERNANDES, 2013).

Vários materiais poliméricos naturais, como celulose, alginato, quitina, colágeno, carragena, quitosana, amido, pectina são comumente utilizados como materiais de suporte. Da mesma forma, uma variedade de suportes inorgânicos também são utilizados na imobilização de enzimas, como a alumina, sílica, zeólitos e sílicas mesoporosas. Vale ressaltar que suportes com grande área superficial sempre são de grande valia para uma boa eficiência de imobilização (AHMAD; SARDAR, 2015).

2.3.1 Poliuretano

Os primeiros polímeros à base de poli(ureia-uretano) foram desenvolvidos pela empresa alemã Bayer em 1937, porém a sua descoberta data de 1848 por Wultz. No início de 1940, as pesquisas já começavam a apontar a PU como um polímero que poderia ser usado como isolante térmico e acústico, além de suporte na construção de navios e aviões. Contudo, somente nas décadas de 50 e 60 que a produção em escala industrial se difundiu e acabou por consolidar-se nos anos 70 em diversos setores, do civil ao alimentício (RANDALL; LEE, 2002; VILAR, 2004, SZYCHER, 2013).

O poliuretano apresenta propriedades interessantes como durabilidade, flexibilidade, bioestabilidade podendo ser sintetizado de forma a torná-lo biodegradável. Características estas, cada vez mais exploradas em virtude da preocupação globalizada com a saúde e o meio ambiente. Diante disto, o poliuretano mostra-se atrativo na aplicação como carreador de fármacos, engenharia de tecidos, desenvolvimento de dispositivos médicos e imobilização de enzimas (ZANETTI-RAMOS et al., 2006; ZANETTI-RAMOS et al., 2008; VALÉRIO; ARAÚJO; SAYER, 2013; VALÉRIO et al., 2014; CIPOLATTI et al., 2015b).

Os poliuretanos abrangem uma ampla classe de materiais quimicamente complexos e que podem conter uma variedade de tipos de ligações, contudo todos têm a ligação poliuretano em comum. Esta ligação é formada a partir da reação entre um grupamento de isocianato com um grupamento álcool de outro componente. Controlando a

composição de cada componente é possível adequar a morfologia e o desempenho do produto final conforme o desejado (KAUSHIVA, 1999).

Ainda com relação a estrutura, 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 (SOARES, 2012).

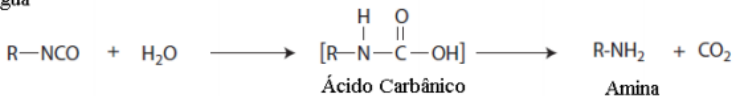
Na produção das espumas de PU existem duas principais reações: reação de crescimento (B) e reação de gelificação (A) (Figura 5). Durante a reação de crescimento há a dispersão de gás dióxido de carbono pela reação do isocianato com a água, fazendo com que haja a formação de bulbos ou células, que estão ligadas em uma estrutura tridimensional. Este gás é responsável pelo crescimento do polímero, agindo como agente de expansão. Já na reação de gelificação, ou reticulação, ocorre a reação do isocianato com o álcool formando o grupamento uretana e uma rede covalente (KAUSHIVA, 1999; SOARES, 2012).

Figura 5 – Reações de formação da espuma de poliuretano.

A. Alcôois



B. Água



A amina reage imediatamente com o isocianato adicional



Fonte: adaptado de SZYCHER, 2013, apud BRESOLIN, 2014.

Há ainda uma terceira reação que ocorre simultaneamente ao processo: entre a amina formada durante a reação de crescimento e outro isocianato gerando um componente uréia. Esta reação pode ser fonte de ligações cruzadas covalentes se o isocianato possuir mais de dois grupos funcionais ou se forem adicionadas aminas polifuncionais. Além disso, devido às fortes interações entre as ligações da uréia, promovidas pelas

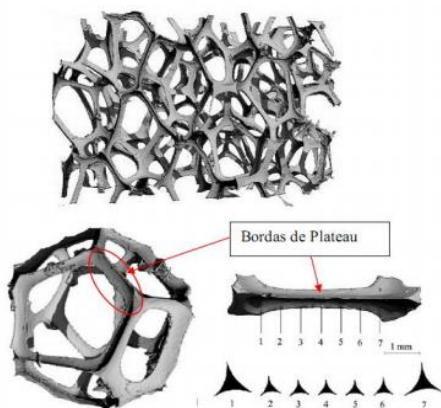
pontes de hidrogênio, formam-se facilmente agregados de vários tamanhos, denominados de esferas de poliuréias, que interagem com os segmentos rígidos da matriz, contribuindo para o aumento do grau de reticulação do polímero e induzindo à abertura das células da espuma (KAUSHIVA, 1999; YILGOR et al., 2006; LAN; HAUGSTAD, 2011; SOARES, 2012).

Todavia, o equilíbrio entre as duas principais reações é o fator primordial que vai proporcionar a morfologia de células abertas na espuma refletindo diretamente nas propriedades físicas do polímero. Caso a reação crescimento, ou de produção de gás, ocorra demasiado rapidamente, as células podem abrir antes que o polímero tenha força suficiente para manter a estrutura celular, resultando no colapso da espuma. Por outro lado, se a reação de gelificação, ou reticulação, ocorrer muito rapidamente, pode resultar em uma espuma estreitamente unida (KAUSHIVA, 1999).

Durante o processo de formação de espumas de PU há a etapa de nucleação. Esta ocorre logo no início do processo juntamente com a homogeneização dos componentes e consiste na pré-formação das bolhas de ar durante a agitação. Estas bolhas receberão o gás carbônico gerado posteriormente expandindo-se. Não há a geração de novas bolhas durante o crescimento da espuma, sendo o número de células finais igual no máximo ao número de células iniciais. Ou seja, esta etapa está diretamente ligada à porosidade que o material poderá exibir (KAUSHIVA, 1999; VILAR, 2004).

As bolhas formadas na etapa de nucleação são muito pequenas e quase esféricas, porém conforme elas expandem, tendem a se alongar na direção das paredes da espuma. Quando o volume da mistura reativa torna-se pequeno em comparação ao volume das bolhas em expansão, a área de contato entre as bolhas adjacentes torna-se uma estrutura triangular chamada tecnicamente de bordas de Plateau (Figura 6). O líquido é transferido das membranas para as bordas de Plateau por fluxo capilar, levando a formação das células poliédricas irregulares, que se aproximam da forma de um octaedro truncado (VILAR, 2004; JANG et al., 2008; ANTUNES, 2015).

Figura 6 – Estrutura da espuma de PU: uma célula, as bordas de Plateau e as respectivas áreas transversais.



Fonte: JANG et al. (2008), apud ANTUNES (2015).

Em relação ao uso do PU nas diferentes áreas do conhecimento, a Tabela 1 apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura relacionando o uso de PU como suporte enzimático.

Tabela 1 – Aplicação de espumas de PU como suporte para imobilização enzimática.

Setor	Aplicação	Enzima	Referencia
	Produção de frutoligosacarídeos para dietas hipocalóricas	<i>Aspergillus niger</i> inulinase	SILVA et al., 2013
Alimentício	Síntese de butirato de etila (éster de sabor frutado)	<i>Candida rugosa</i> lipase	PIRES-CABRAL et al., 2007; PIRES-CABRAL et al., 2009; PIRES-CABRAL et al., 2010
	Produção de xarope de açúcar invertido	β -fructofuranosidase invertase	CADENA et al., 2011; CADENA et al., 2010

	Hidrólise de oligossacarídeos pécticos	<i>Aspergillus niger</i> pectinase DA6L	BUSTAMANTE-VARGAS <i>et al.</i> , 2015
Farmacêutico	Síntese de biosensor	Glucose oxidase	İNOĞLU <i>et al.</i> , 2008; KAYRAK-TALAY <i>et al.</i> , 2008
Químico	Síntese de lauril laurato	<i>Yarrowia lipolytica</i> lipase Lip2	CUI <i>et al.</i> , 2013
	Síntese de biossensor	Peroxidase HRP	VESELOVA & SHEKHOVTSOVA, 1999
Síntese de ésteres de ácidos graxos	Síntese de ésteres	<i>Candida antarctica</i> B lipase	NYARI <i>et al.</i> , 2016
Biodiesel	Síntese	<i>Candida antarctica</i> B lipase	SANTIN <i>et al.</i> , 2014

2.4 HIDRÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS

Óleos e gorduras têm um papel primordial na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K1. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos. Esses tipos de ácidos graxos são chamados essenciais porque não podem ser sintetizados pelo organismo humano e devem ser fornecidos através da dieta (CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004).

Os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3 e 6 são elementos lipídicos estruturais de importância vital para as membranas celulares e refletem diretamente em uma ampla variedade de funções biológicas. Esses ácidos graxos são fundamentais na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares, além de outras atuações importantes na hipertensão arterial, diabetes, artrites e doenças autoimunes (CARVALHO *et al.*, 2003; BUENO *et al.*, 2005).

Nos últimos quinze anos tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Mundialmente é

estimada uma produção anual de óleos e gorduras de aproximadamente 100 milhões de toneladas (CASTRO et al., 2004).

Em vista deste grande potencial, pesquisas voltadas a esta área têm relatado a aplicação de diferentes métodos físicos, químicos e enzimáticos visando à obtenção de concentrados de ácidos graxos livres, a partir de diversos óleos vegetais. Entre esses processos, a hidrólise enzimática apresenta vantagens econômicas e técnicas, pois pode ser realizada em condições amenas (20 a 40°C e pressão atmosférica), levando a uma menor demanda energética em comparação aos processos físico-químicos (RITTNER, 1996; CARVALHO et al., 2003).

Apesar de inúmeros trabalhos relatarem o emprego da hidrólise enzimática principalmente para a obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados, outra aplicação interessante fica por conta da fabricação de sabão, agentes tensoativos e detergentes, (GUTIÉRREZ-AYESTA et al., 2007).

2.5 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Como discorrido ao longo deste capítulo, o interesse pela imobilização enzimática é cada vez maior visto o seu amplo potencial de aplicação industrial. Aliado a isto, a grande vantagem no emprego de enzimas imobilizadas fica no âmbito econômico devido a possibilidade de recuperação e reutilização do imobilizado.

Neste sentido, vários materiais são relatados como suportes para imobilização enzimática conferindo uma maior estabilidade operacional ao imobilizado. Dentre estes materiais, o poliuretano vem sendo apontado e utilizado com sucesso nos processos de imobilização de diversas enzimas. Diante disto, este trabalho almeja o estudo da imobilização de lipase NS-40116 em suporte polimérico de poliuretano por meio de diversas técnicas. A NS-40116 é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificado recentemente desenvolvida pela Novozymes®.

O suporte com enzima imobilizada será devidamente caracterizado e aplicado na hidrólise de óleo vegetal com a finalidade de produzir ácidos graxos, os quais geram grande interesse em aplicações industriais no setor químico, farmacêutico e alimentício, sendo empregados tanto na produção de sabão e detergentes, como de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados essenciais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, metodologias e equipamentos que foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Todos os experimentos e análises realizados foram desenvolvidos no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) Laboratório de Controle de Processos (LCP), Laboratório de Separação por Membranas (LABSEM) e Central de Análises do EQA, pertencentes ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) do Centro Tecnológico (CTC), e no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), todos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) situada em Florianópolis/SC.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Suporte

Os monômeros utilizados para a síntese do suporte polimérico de poliuretano, poliálcool poliéter e diisocianato (TDI), foram gentilmente cedidos pela empresa Mannes Ltda (empresa produtora de espuma flexível de poliuretano).

3.1.2. Biocatalisador

A enzima NS 40116 utilizada neste trabalho apresentava-se como uma solução líquida de enzima livre termoestável em uma concentração inicial de 35 mg/mL, desenvolvida pela empresa Novozymes®, produzida e modificada a partir do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, a qual foi cedida gentilmente pelo fabricante.

3.1.3 Reagentes

A Tabela 2 traz os demais reagentes utilizados para a elaboração deste trabalho.

Tabela 2 - Reagentes utilizados.

Reagente	Pureza	Função	Fornecedor
Glutaraldeído	25% em água	Ligante covalente/cruzada	Sigma-Aldrich

Cloridrato de dopamina	98,5%	Ligante covalente/cruzada	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio monobásico	99%	Preparo de solução tampão	Lafan Vetec
Fosfato de sódio dibásico	98%	Preparo de solução tampão	Lafan Vetec
Tris(hidroximetil) aminometano	99,8%	Preparo de solução tampão	Sigma-Aldrich
Ácido Clorídrico (HCl)	37%	Preparo de solução tampão	Dinâmica
Hidróxido de Potássio (KOH)	85%	Preparo de solução tampão	Dinâmica
Ácido Fosfórico (H ₃ PO ₄)	85%	Preparo de solução tampão	Vetec
Fosfato de Potássio Monobásico	99%	Preparo de solução tampão	Dinâmica
Hidróxido de Sódio (NaOH)	97%	Titulação e preparo de solução tampão	Dinâmica
Álcool Metílico	99,5%	Solvente	Vetec
Álcool Etílico	99,5%	Solvente	Vetec Neon Lafan Dinâmica
<i>p</i> -nitrofenil palmitato (<i>p</i> -NPP)	99%	Determinação de atividade enzimática	Sigma-Aldrich
Óleo de Soja Refinado		Matéria-prima para hidrólise	Soya

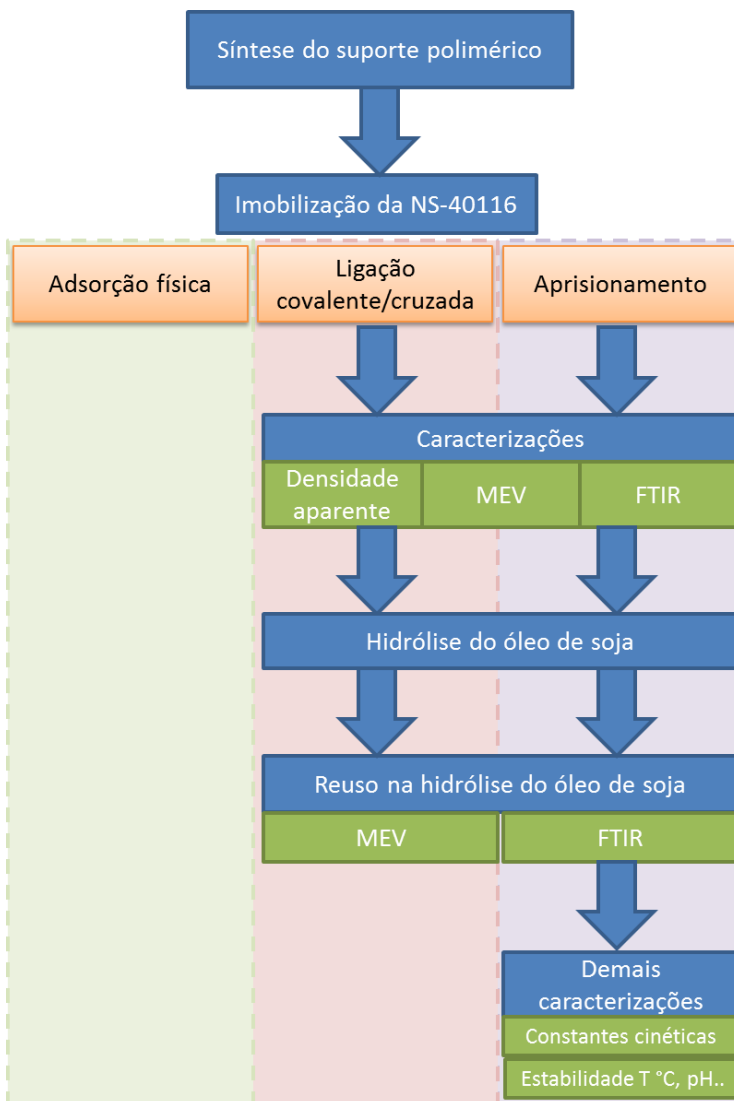
Fonte: do autor.

Óleo de soja refinado (Soya) foi obtido no mercado local e utilizado sem nenhum tratamento adicional. Por se tratar de óleo comercial a legislação determina um baixo índice de acidez (0,027% em ácido oléico).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

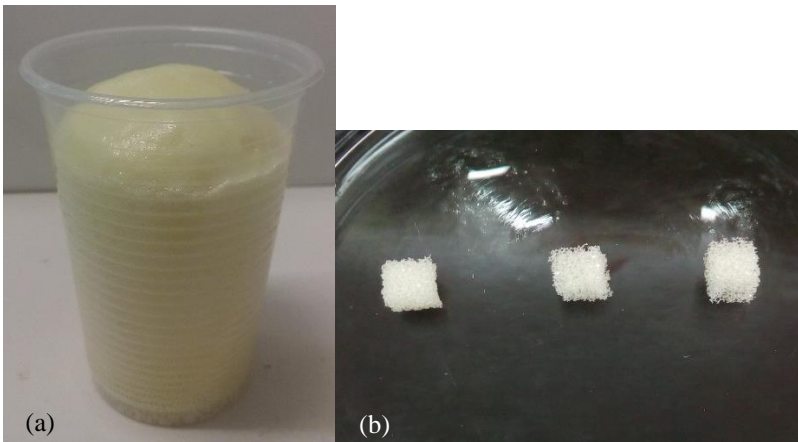
Figura 7 – Fluxograma das atividades desenvolvidas.



3.2.2 Síntese do suporte polimérico

A síntese do suporte polimérico de PU foi realizada segundo metodologia descrita por Fernandes (2013), que testou diferentes razões polioli/isocianato na síntese de espumas de PU para a imobilização por aprisionamento *in situ* de lipase CalB. De acordo com seu trabalho, a avaliação das estruturas das espumas formadas permitiu identificar que na razão 5:3 (v/v) de polioli/isocianato ocorreu a formação de uma espuma mais flexível com poros mais uniformes. Assim, a síntese do suporte foi realizada em copos plásticos de 50 mL pela adição de 5 mL de polioli poliéter e 3 mL de tolueno diisocianato (TDI) sob agitação com auxílio de bastão de vidro por 1 minuto para completa homogeneização (FERNANDES, 2013). Após o processo de polimerização (5 minutos), a espuma formada foi mantida em temperatura ambiente por 48 horas para completa reticulação e cura da estrutura. Após este tempo os suportes poliméricos foram cortados em cubos com 5 mm de lado (CUI et al., 2013) (Figura 8).

Figura 8 – Espuma de poliuretano (PU) (a) crescimento da espuma de poliuretano – (b) espuma de poliuretano cortada em cubos com 5 mm de lado.



Fonte: do autor.

3.2.3 Diálise e liofilização da Enzima NS-40116

A etapa de diálise foi necessária para a remoção de estabilizantes e possíveis impurezas do concentrado comercial além de permitir a utilização da enzima sem a fase aquosa para o processo de imobilização por aprisionamento *in situ*. O processo de diálise foi desenvolvido em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,0, por 96 horas com trocas constantes do tampão. Após, a enzima foi congelada em ultrafreezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, liofilizada por 48 horas (Liofilizador Liotop modelo L 101n de série 64815) e armazenada a temperatura de refrigeração de $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.4 Imobilização da NS-40116

A imobilização da enzima foi realizada seguindo três métodos a fim de avaliar a mais eficiente para o propósito deste trabalho.

3.2.4.1 Adsorção

O procedimento de imobilização da NS-40116 por adsorção foi realizado em erlenmeyer com 25 mL de solução enzimática em diferentes concentrações (5,5, 10, 20, 30 mg/mL) com 0,25 g de suporte polimérico de PU. A concentração da solução enzimática foi ajustada com a diluição da formulação líquida bruta em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,0. O processo ocorreu durante 24 horas em shaker a 100 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao final do experimento, os suportes poliméricos foram filtrados, lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente por 48 horas.

3.2.4.2 Ligação covalente/cruzada

A reação de imobilização da NS-40116 por ligação covalente/cruzada consistiu em duas etapas. Na primeira etapa, 0,75 g de suporte polimérico de PU foi colocado em erlenmeyer com 50 mL de solução de glutaraldeído 5%. A reação foi mantida em shaker a 50 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Ao término do período, os suportes poliméricos foram filtrados, lavados com água destilada e seguiram para a segunda etapa.

Além do glutaraldeído, a dopamina também foi testada como ligante. O procedimento foi semelhante ao anterior: 0,75 g de suporte

polimérico de PU foi colocado em erlenmeyer com 50 mL de solução de cloridrato de dopamina 2 mg/mL em tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 8,5. A reação foi mantida em shaker a 50 rpm e temperatura de 25 °C por 24 horas. Ao término do período, os suportes poliméricos foram filtrados, lavados com água destilada e seguiram para segunda etapa.

A segunda etapa ocorreu tal qual a do item 3.2.4.1. Porém, a concentração da solução enzimática utilizada foi somente a de 30 mg/mL. As soluções tampão utilizadas para a diluição das soluções enzimáticas foram tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 e tampão tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 8,5, respectivamente.

3.2.4.3 Aprisionamento *in situ*

O processo de imobilização por aprisionamento *in situ* foi baseado em trabalho desenvolvido por Nyari (2016), o qual consistiu na adição de diferentes frações da enzima NS-40116 liofilizada (8, 16, 32, 64, 125, 256, 400, 512 mg) durante a síntese da espuma de PU. Estas frações foram adicionadas na fase polioliol e homogeneizadas durante 2 minutos antes da adição da fase TDI. A sequência do procedimento ocorreu de acordo com o item 2.2.1.

3.2.5 Determinação da Atividade de Hidrólise de *p*-NPP

Para determinação da atividade de hidrólise do *p*-NPP foi utilizada metodologia modificada de Chiou (2004) usando uma solução 0,5% de *p*-NPP (m/v) em etanol. O aumento da absorbância causada pela liberação do *p*-nitrofenol na hidrólise do *p*-NPP foi medida espectrofotometricamente. Na reação foi utilizado 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 e incubação em banho termostaticado (Dist DI 20-epro) por 5 min à 30 °C. Após, foi adicionado 2 mL de NaOH 0,1 M seguido por centrifugação (Centrifuga Eppendorf AG 22331 70 W) à 10.000 rpm por 10 min. Uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante foi diluído em 10 FOLDS de água destilada e a leitura realizada em espectrofotômetro (Hitachi U-1900) a 400 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida pela quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 mmol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições experimentais. As medidas de atividade hidrolítica foram realizadas em triplicata de análise (n=3).

3.2.6 Cálculo de rendimento de imobilização

O rendimento da imobilização foi baseado no percentual de atividade relativo à enzima livre que o suporte com enzima imobilizada foi capaz de reter e foi calculado em triplicata (n=3), considerando o valor de atividade que o suporte com enzima imobilizada apresenta em relação à enzima livre. A atividade relativa (AR), expressa em %, foi determinada conforme Equação 1:

$$AR (\%) = \frac{U_I}{U_L} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

U_I = Atividade do suporte com enzima imobilizada em U/g;

U_L = Atividade da enzima livre em U/g.

3.2.7 Determinação do teor de proteína

A concentração de proteína nos extratos enzimáticos foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando como padrão uma curva de albumina de soro bovino.

3.2.8 Caracterização estrutural do suporte e enzima imobilizada

3.2.8.1 Densidade aparente

A densidade aparente dos suportes poliméricos de PU foi calculada conforme American Society for Testing and Materials (ASTM) na norma ASTM D 3574-e segundo a Equação 2:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

ρ = Densidade em (g.cm⁻³);

m = Massa do suporte polimérico em g;

V = volume da espuma em cm³;

Os suportes poliméricos foram pesados em balança digital com precisão de 0,0001 g e capacidade de 220 g (MARTE AY220) e a medida foi realizada com auxílio de paquímetro.

3.2.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias do suporte polimérico de PU e do suporte polimérico de PU com enzima imobilizada foram realizadas a partir de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-6390LV. Os suportes poliméricos cortados foram fixados com fita de carbono em suportes e recobertos com ouro. A voltagem de aceleração utilizada foi de 5 kV com magnificação de até 1000x.

3.2.8.3 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em aparelho Cary 660 Series FTIR Spectrometer (Agilent Technologies) com acessório de refletância total atenuada horizontal (ZnSe). As amostras foram colocadas diretamente sobre o cristal e a média de 20 varreduras no intervalo de 4000-650 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} foi feita para cada amostra. As medidas das amostras foram divididas pelo Background de ar, sem nada sobre o cristal. Os dados foram tratados pelo software do equipamento e após, plotados no Origin.

3.2.9 Hidrólise do óleo de soja

A metodologia utilizada foi adaptada de Sousa et al. (2015) e Zenevicz et al. (2015). O procedimento consistiu na adição em reator de 100 mL de óleo de soja refinado juntamente com 2 mL de água destilada e 0,5 mL de enzima livre bruta ou 1 grama de suporte polimérico de PU com enzima imobilizada. O sistema vedado foi mantido a 45 °C e 300 rpm com uso de agitador magnético (Ika C-Mag HS 7). Alíquotas foram tiradas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para análise de acidez.

A avaliação da quantidade de ácidos graxos livres presentes no meio foi adaptada da metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz e realizado em triplicata (n=3) (IAL, 2008). Uma alíquota de aproximadamente 3 g foi retirada do reator e colocada em erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, foi adicionado 40 mL de etanol para dissolução do

óleo e duas gotas de uma solução alcoólica de fenolftaleína a 1% que atua como indicador. O conteúdo do erlenmeyer foi titulado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L até o aparecimento da coloração rosa por no mínimo 30 segundos sob forte agitação. O percentual de acidez foi determinado pela Equação 3:

$$\% \text{ de Acidez} = \frac{V * M * 282}{m * 10}$$

(Equação 3)

Onde:

V = Volume de NaOH gasto na titulação (mL);

M = Concentração da solução de NaOH utilizada (mol/L);

m = Massa da alíquota analisada (g)

3.2.10 Determinação da capacidade de reuso

Este ensaio foi realizado com a finalidade de avaliar a capacidade de ciclos de reuso que o suporte contendo NS-40116 é capaz de suportar. Após o procedimento 2.2.7 os suportes poliméricos foram filtrados, lavados com etanol para retirada do óleo residual, lavados novamente com uma solução 1:1 de etanol e água (v/v), lavados novamente com água destilada e colocados para secar por 48 horas a temperatura ambiente. Após a completa secagem, os suportes poliméricos foram aplicados novamente na hidrólise do óleo de soja descrito no item 3.2.9.

3.2.11 Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas foram determinadas utilizando *p*-npp como substrato em diferentes concentrações (0,125, 0,25, 0,5, 0,875, 1,5 e 1,75% m/v em etanol). Os valores de K_m e $V_{máx}$ para a enzima livre e suporte polimérico de PU com enzima imobilizada foram calculados pela plotagem de Lineweaver-Burk.

3.2.12 Avaliação da estabilidade à temperatura, pH, solvente e condições de armazenamento

Os ensaios de estabilidade foram realizados para a enzima livre e para a melhor condição de suporte polimérico de PU com enzima imobilizada.

3.2.12.1 Estabilidade à temperatura

O ensaio de estabilidade à temperatura foi realizado a fim de avaliar a capacidade do suporte em manter a atividade da enzima quando submetidos a diferentes temperaturas por diversos tempos. Para este ensaio, alíquotas de 0,05 g de enzima livre/enzima imobilizada foram colocadas em tubos de ensaio com 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 e submetidas à temperaturas de 25, 45 e 60 °C durante tempos de 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas. Após o período de tempo determinado, as alíquotas foram retiradas e quantificadas quanto à atividade de hidrólise de *p*-npp (item 3.2.5).

3.2.12.2 Efeito e estabilidade ao pH

O ensaio de efeito do pH foi realizado a fim de avaliar a capacidade do suporte em manter a atividade da enzima quando submetidos à diferentes pH. Assim, alíquotas de 0,05 g de enzima livre/enzima imobilizada foram colocadas em tubos de ensaio com 1 mL de solução tampão e imediatamente submetidas a determinação de atividade de hidrólise de *p*-npp (item 2.2.4). Soluções tampão de diversos pH foram utilizadas: fosfato pH 2, fosfato pH 5, fosfato pH 7, fosfato pH 9 e Ringer pH 12 (European Pharmacopoeia, 1996; MORITA; ASSUMPCÃO, 2007).

O ensaio de estabilidade ao pH foi realizado para dois pH a fim de avaliar a capacidade do suporte em manter a atividade da enzima por diferentes tempos quando em contato com estes pH. Alíquotas de 0,05 g de enzima livre ou enzima imobilizada foram colocadas em tubos de ensaio com 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 ou fosfato de potássio 130 mmol.L⁻¹ pH 9,0 por 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas e mantidas à temperatura ambiente. Após o período de tempo determinado, as alíquotas foram quantificadas quanto à atividade de hidrólise de *p*-npp (item 3.2.5).

3.2.12.3 Estabilidade ao solvente

O ensaio de estabilidade ao solvente foi realizado para os solventes etanol e metanol a fim de avaliar a capacidade do suporte em manter a atividade da enzima por diferentes tempos quando em contato com estes solventes. Alíquotas de 0,05 g de enzima livre/enzima imobilizada foram colocadas em tubos de ensaio com 1 mL de álcool

etílico/álcool metílico por 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas e mantidas à temperatura ambiente. Após o período de tempo determinado, as alíquotas foram quantificadas quanto à atividade de hidrólise de *p*-npp (item 3.2.5).

3.2.12.4 Estabilidade ao armazenamento

Este ensaio foi realizado visando avaliar a capacidade do suporte em prolongar e manter a atividade da enzima quando em diferentes condições de armazenamento. Assim, uma quantidade de amostra foi mantida sob temperatura de refrigeração (4 °C) e outra sob temperatura ambiente (25 °C). Em intervalos definidos, alíquotas dessas amostras foram retiradas e quantificadas quanto à atividade de hidrólise de *p*-npp (item 3.2.5).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho. Para facilitar a compreensão este capítulo foi dividido em três partes, sendo primeiramente explanados os dados referentes ao processo de imobilização, seguido da aplicação e reuso das melhores condições e por fim as caracterizações e análises da melhor condição de imobilização frente à enzima livre.

4.1 IMOBILIZAÇÃO DA NS-40116

Os primeiros ensaios de imobilização da lipase NS-40116 foram realizados por três metodologias de imobilização. Foram avaliados o método de adsorção, o de ligação covalente/cruzada e o de aprisionamento *in situ*.

4.1.1 Adsorção

Em relação aos resultados obtidos, em termos de atividade enzimática residual, para o processo de imobilização por adsorção, observou-se que maiores concentrações de enzima NS-40116 resultaram em maiores rendimentos em termos de adsorção. No entanto, o imobilizado final apresentou em média 58% de atividade enzimática residual quando utilizado 30 mg/mL de caldo enzimático. Não foram realizados ensaios com concentrações superiores, pois a concentração máxima do caldo enzimático era de 35 mg/mL, sendo assim, uma técnica adicional de secagem/concentração do caldo se faria necessária para avaliação da imobilização utilizando maiores concentrações de enzima.

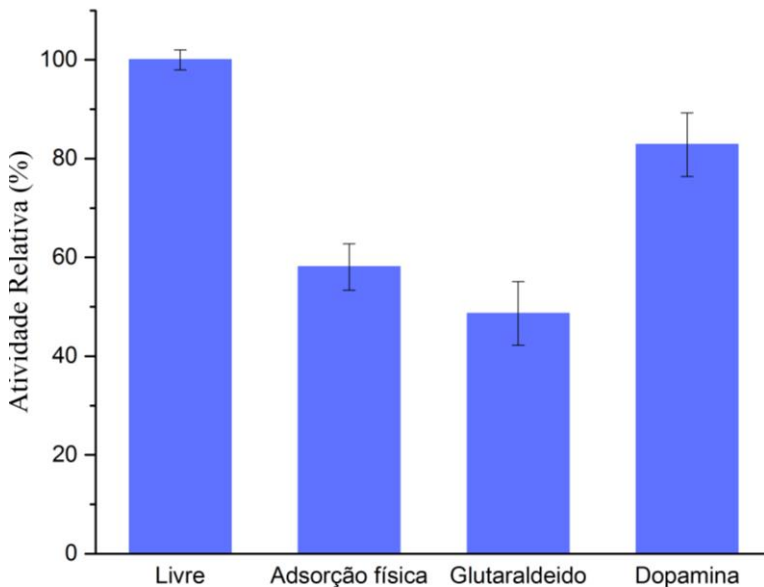
Em geral, esta técnica de imobilização se baseia na interação da enzima com o suporte por meio de ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

4.1.2 Ligação covalente/cruzada

Com o objetivo de aumentar a eficiência da imobilização atingida pelo processo de adsorção, foram avaliados dois agentes de modificação

do suporte de PU, glutaraldeído e dopamina. Ambos os compostos possuem a capacidade de formar ligações covalentes ou cruzadas, conferindo ao suporte maior afinidade com as enzimas e consequente aumento da eficiência da imobilização. Diante disso, os parâmetros utilizados para a melhor condição obtida no processo de adsorção foi repetido utilizando agora os suportes modificados. Os resultados alcançados, em termos de atividade residual da enzima NS-40116 imobilizada em suporte de PU são apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Atividade residual em *p*-NPP do suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por ligação covalente/cruzada.



A Figura 9 mostra que o uso do glutaraldeído como agente de modificação do suporte reduziu a atividade residual do suporte para 48 % em relação à atividade da enzima livre. Tal comportamento pode estar relacionado ao emprego de um tempo de tratamento prolongado e uma concentração elevada de glutaraldeído. Estes fatores podem resultar em uma polimerização descontrolada com uma quantidade muito alta de

ligações cruzadas entre as próprias moléculas de glutaraldeído no interior do suporte impedindo a difusão e ligação adequada das enzimas. Além disso, podem favorecer a formação de um número elevado de ligações entre a enzima e o suporte reduzindo a atividade catalítica do biocatalisador (MONSAN, 1978; BETANCOR et al., 2006).

Por outro lado, o suporte polimérico de PU revestido com dopamina apresentou 83% de atividade enzimática residual. A dopamina, além de apresentar fortes propriedades de aderência, possui a presença de grupos funcionais catecol e amina que podem servir tanto para a modificação covalente como para o carregamento de íons metálicos (LEE et al., 2007; FAURE et al., 2013; PARDIEU et al., 2016; LEFEBVRE et al., 2017).

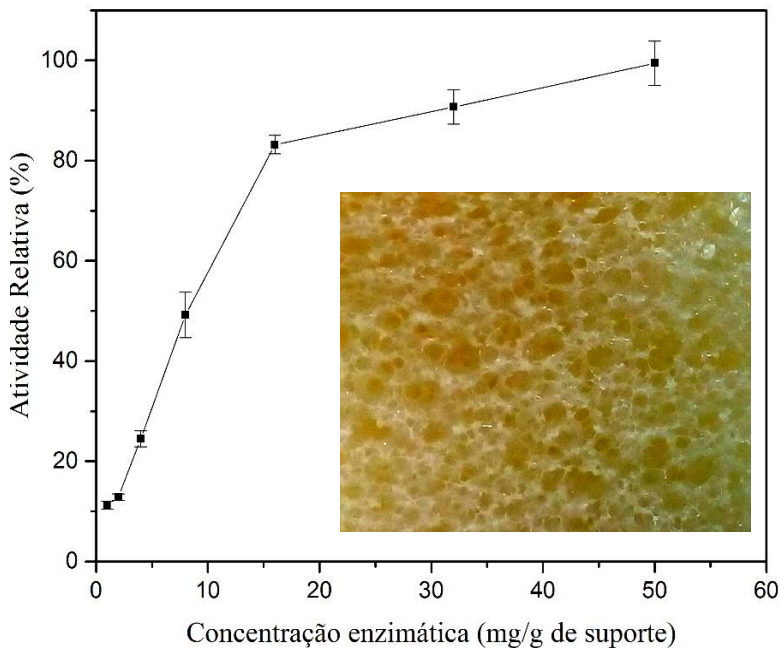
A utilização da dopamina como agente de ligação para a imobilização enzimática é muito recente. Chao et al. (2013) estudaram a imobilização de lacase em nanotubos de carbono com o uso de dopamina como agente de revestimento de superfície e obtiveram uma adsorção de 168,8 mg /g de suporte contra 11,6 mg /g de suporte sem o uso de dopamina, mostrando mais uma vez a eficiência da sua utilização.

4.1.3 Aprisionamento *in situ*

Um primeiro ensaio de imobilização da enzima NS-40116 foi realizado utilizando o caldo enzimático. Em um primeiro momento o suporte polimérico apresentou uma boa expansão e volume, contudo, durante a etapa de cura a estrutura colapsou iniciando o processo de encolhimento. A água no processo de polimerização da PU pode atuar como agente de expansão, diminuir a densidade da espuma e devido à formação de poliuréia, aumentar a dureza, alongamento e resistências à tração. Porém, um excesso de água pode acelerar a reação de crescimento da espuma fazendo com que as células abram antes do polímero ter força o suficiente para manter a estrutura resultando no colapso da espuma (KAUSHIVA, 1999; VILAR, 2004).

Diante do exposto, optou-se pela aplicação da enzima dialisada e liofilizada neste processo de imobilização. O processo de diálise permitiu a retirada, além da fase aquosa, de estabilizantes e possíveis impurezas presentes no caldo enzimático bruto. Os resultados obtidos, em termos de atividade residual da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU, para as diferentes concentrações de enzima são apresentadas na Figura 10.

Figura 10 – Atividade residual em *p*-NPP da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ*. Imagem canto inferior direito: estrutura do suporte de PU com NS-40116 imobilizada.



Como observado na Figura 10, o aumento da concentração da enzima NS-40116 no processo de polimerização resultou no aumento da eficiência de imobilização até a máxima imobilização (400 mg de enzima dialisada e liofilizada equivalente a 5% m/m de suporte polimérico) foi atingido, no qual o suporte obteve seu melhor resultado, mantendo 99,4% da atividade enzimática inicial. A Figura 10 mostra ainda uma imagem da estrutura do suporte polimérico obtido nesta condição onde é possível observar que o suporte obtido não apresentou separação de fases, boa distribuição e homogeneidade dos poros.

Resultado semelhante foi obtido por Nicoletti (2014) durante a imobilização de *Candida antarctica* B (CalB lipase) em espumas flexíveis de PU. Silva et al. (2013) avaliaram a imobilização de inulinase de *Aspergillus niger* em espuma flexível de PU. Os autores conseguiram um valor correspondente a 10% m/m de extrato enzimático

imobilizado. Bustamante-Vargas et al. (2015) avaliaram a imobilização de diferentes concentrações de pectinase comercial de *Aspergillus niger* em espuma rígida de PU, sendo que a quantidade máxima de enzima imobilizada foi 4% (m/m de suporte polimérico).

A fim de averiguar o efeito que uma concentração de enzima maior que o ponto de saturação do suporte apresentaria sobre o sistema, um próximo ensaio de imobilização foi executado aumentando para 512 mg (6,4% m/m de suporte polimérico) a quantidade de enzima NS-40116 dialisada e liofilizada adicionada ao suporte. A partir do resultado foi observado que o aumento na concentração de enzima prejudicou a formação do suporte polimérico de PU, com a formação de poros mais heterogêneos e desuniformes, resultado da reação de gelificação, ou reticulação, ocorrida precocemente à expansão da espuma (KAUSHIVA, 1999).

4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO SUPORTE POLIMÉRICO

As caracterizações dos suportes poliméricos foram realizadas nas diferentes etapas dos processos de imobilização. Para estas caracterizações foram utilizadas as melhores condições observadas nos processos de imobilização, sendo: a enzima imobilizada por ligação covalente/cruzada com dopamina (ligação química) e a enzima imobilizada por aprisionamento *in situ*.

A Tabela 3 traz os valores encontrados para a concentração de enzima NS-40116 nos suportes poliméricos de PU após os processos de imobilização.

Tabela 3 – Concentração de enzima NS-40116 nos suportes poliméricos de PU.

Enzima	Concentração de enzima* (mg.g ⁻¹)
Enzima livre em caldo	35,0 ± 0,1
Enzima livre liofilizada	633,86 ± 18,58
PU + Enzima (ligação química)	162,58 ± 9,92
PU + Enzima (<i>in situ</i>)	31,69 ± 0,93

* Valores médios referente a medidas em triplicata (n=3).

Pode-se observar pela Tabela 3 que o processo de diálise e liofilização permitiu concentrar bastante o caldo enzimático original chegando a $633,86 \text{ mg.g}^{-1}$, ou seja, a enzima liofilizada em pó apresenta uma pureza em torno de 63%.

É possível verificar também uma grande diferença entre os teores de enzima encontrados nos suportes poliméricos de PU submetidos aos diferentes métodos de imobilização. Para o suporte polimérico de PU com enzima imobilizada por ligação química a concentração de enzima encontrada foi de $162,58 \text{ mg.g}^{-1}$ de suporte. Valor bem superior ao encontrado para o suporte polimérico com enzima imobilizada por aprisionamento *in situ*: $31,69 \text{ mg.g}^{-1}$. Porém, em termos de atividade residual o comportamento é inverso, como pôde ser observado nas discussões do item 4.1. Estes resultados apontam que apesar da grande quantidade de enzima presente no suporte polimérico de PU com enzima imobilizada por ligação química, grande parte destas está inativa ou perdeu atividade. Esta inativação ou perda de atividade pode estar relacionada a diversos fatores como a elevada quantidade de ligações covalentes/cruzadas presentes que podem dificultar a ação da enzima (efeitos difusionais e transferência de massa) ou ainda promover a ligação da enzima ao suporte por meio de ligações que afetem a sua atividade catalítica como discutido no item 2.2.2.

A densidade aparente é a razão entre a massa e o volume geométrico do corpo de prova, que inclui o material polimérico e o gás dentro das células da espuma, ou seja, corresponde ao volume ocupado por uma determinada massa de sólido, incluindo a porosidade. Assim, o controle da densidade dos suportes poliméricos de poliuretano é feito, principalmente, através das quantidades empregadas de água e agentes de expansão auxiliares, como o cloreto de metileno, acetona e CO_2 (NICOLETTI, 2014). A Tabela 4 apresenta os valores de densidade aparente para o suporte polimérico de PU sem enzima e com enzima NS-40116 imobilizada.

Tabela 4 – Densidade aparente dos suportes poliméricos de PU.

Suporte	Densidade aparente* (g.cm^{-3})
PU sem enzima	$0,054 \pm 0,008$
PU + Enzima (ligação química)	$0,070 \pm 0,016$
PU + Enzima (<i>in situ</i>)	$0,094 \pm 0,017$

* Valores médios referente a medidas em triplicata (n=3).

Nyari et al. (2016) encontraram valores de densidade aparente semelhantes aos deste trabalho ($0,029 \pm 0,015$), enquanto que Nicoletti et al. (2015) encontraram valores bem superiores ($0,627 \pm 0,140$). Ambos os estudos foram de imobilização de *Candida antarctica* B (CalB lipase) em espuma flexível de poliuretano.

A partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar a morfologia dos suportes poliméricos em diferentes etapas do processo de imobilização. A Figura 11 apresenta o suporte de poliuretano antes da imobilização sendo possível a visualização dos poros (Fig. 11a) resultante da expansão devido liberação do CO_2 durante crescimento da espuma e as bordas de Plateau (Fig. 11b).

A partir das figuras, observa-se que o suporte de PU com enzima imobilizada por ligação química (Fig. 11c e Fig. 11d), aparentou superfície rugosa, sugerindo cobertura por uma camada de enzima NS-40116 aderida às micropartículas, efeito este, atribuído à dopamina e componentes presentes no caldo enzimático. Por outro lado, o suporte de PU com enzima imobilizada por aprisionamento *in situ* (Fig. 11e e Fig. 11f), apresentou superfície lisa semelhante ao suporte sem presença de enzima, indicando que a enzima está possivelmente ligada às cadeias poliméricas na estrutura polimérica.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) confirmou a formação de ligações químicas relacionadas a formação de poliuretano, imobilização da enzima e presença da dopamina na estrutura polimérica como apresentado na Figura 12 e Figura 13.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura do suporte de PU (a) e (b), suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por ligação química (c) e (d) e suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por aprisionamento *in situ* (e) e (f).

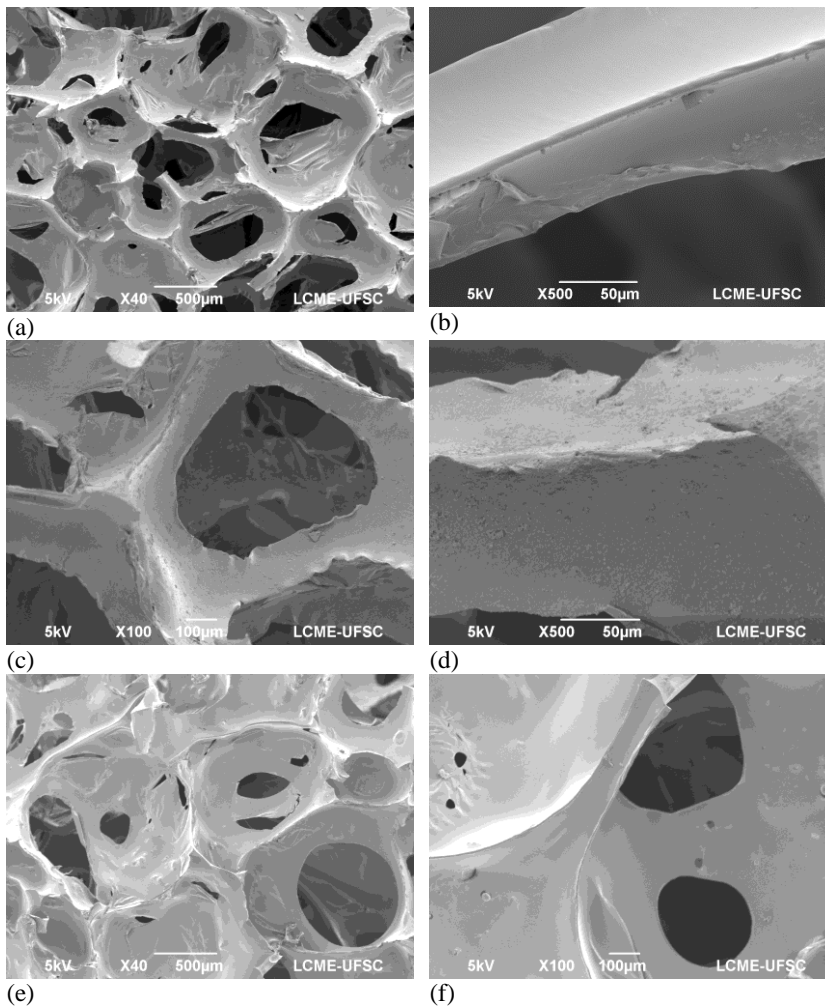
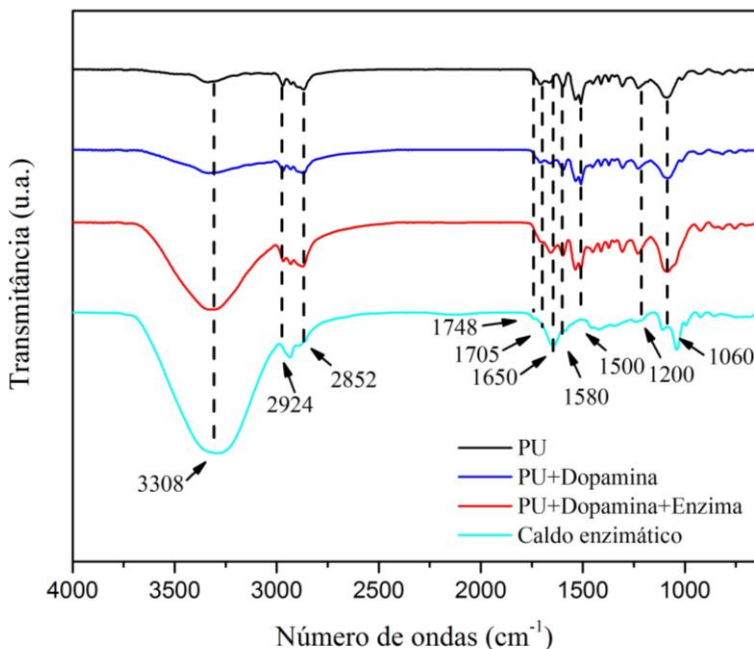


Figura 12 – Espectro de FTIR obtido para as etapas envolvidas na síntese de suporte polimérico de PU com NS-401 16 imobilizada por ligação química.

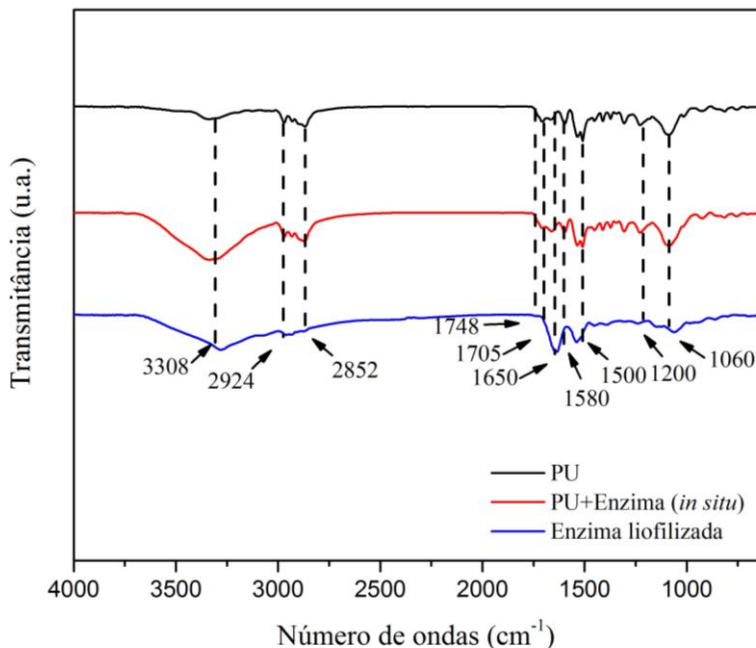


Tanto na Figura 12 quanto na Figura 13 o biocatalisador apresentou espectro típico, com bandas de absorção associadas com grupo amina (CONH), primário e secundário, entre 1000-1200 cm^{-1} e 1580 e 1650 cm^{-1} (BARTH et al., 2007). É possível visualizar o estiramento presente em 1060 cm^{-1} caracterizando a presença de ligações C–NH–C (BARNES et al., 2011) e o estiramento presente em 3316 cm^{-1} , o qual é caracterizado pelas ligações O–H e a presença de água residual (STUARD, 2004).

Os suportes poliméricos nas Figuras 12 e Figura 13 apresentaram na região de 1200 cm^{-1} a presença de ligações C=O=C (BARNES et al., 2011). Há formação de uretano na região de 1600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} (ZANETTI-RAMOS et al., 2006) e ligações de ureia na região de 1680 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} (VALÉRIO, ARAÚJO & SAYER, 2013). A região em 1705 cm^{-1} é característica de ligações carbonila. A faixa que compreende 2924 cm^{-1} a 2852 cm^{-1} é característica quando há presença

de C–H (STUARD, 2004). A mesma região a $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída à ligação entre a enzima e o grupo funcional (NH) a partir de poliuretano. Nos espectros, observa-se na região de 3308 cm^{-1} referente a hidroxila residual (BARNES et al., 2011). Após imobilização, os picos característicos da enzima foram alterados, possivelmente devido à reação dos grupos amina das enzimas com o grupo diisocianato durante a incorporação da enzima livre para a superfície das partículas de polímero, mudando as bandas de absorção.

Figura 13 – Espectro de FTIR obtido para o suporte polimérico de PU com NS-40116 imobilizada por aprisionamento *in situ*.

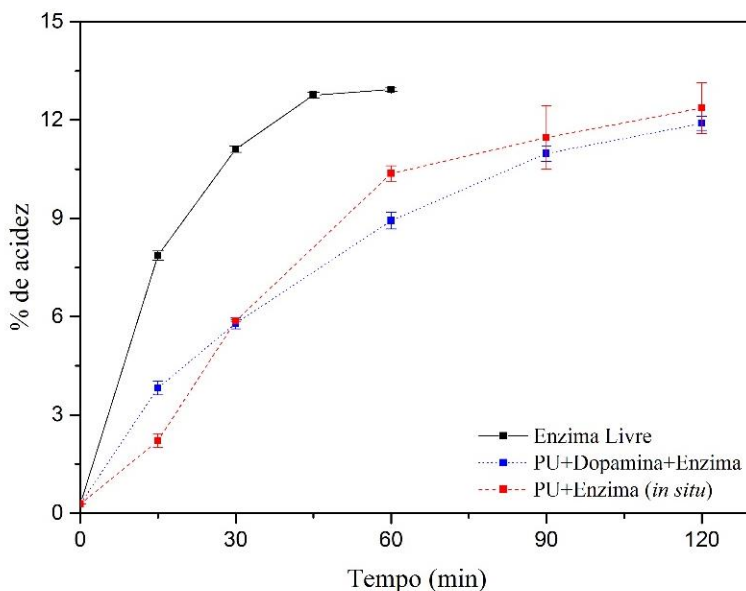


4.3 HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA

A lipase NS-40116 possui a capacidade de hidrolisar óleos vegetais, sendo que a hidrólise completa dos triglicerídeos irá produzir ácidos graxos livres e glicerol. Desta forma, tomando um óleo com

propriedades conhecidas como base, é possível determinar o incremento do percentual de acidez com a liberação de ácidos graxos quando colocado em contato com o biocatalisador. Os ensaios de aplicação da enzima livre e enzima imobilizada em suporte polimérico de PU na hidrólise do óleo de soja foram realizados a fim de avaliar a eficiência do imobilizado. A Figura 14 apresenta os valores obtidos, em percentual de acidez, para os sistemas utilizando a enzima livre (padrão), enzima imobilizada por ligação química e enzima imobilizada por aprisionamento *in situ*.

Figura 14 – Teores de acidez obtidos a partir da hidrólise do óleo de soja.



A partir dos resultados, observou-se que todos os sistemas foram capazes de atingir a saturação da reação (12-13% de acidez), a qual cessa a partir do momento que toda a água disponível é consumida. Os resultados confirmam a imobilização da enzima NS-40116 nos suportes poliméricos e mostram também que a capacidade catalítica foi mantida. Em relação ao tempo de reação para se alcançar o mesmo teor de acidez, foi observado que o tempo para se chegar à saturação para os sistemas contendo o catalisador imobilizado foi de 120 min enquanto que para a enzima livre foi de 60 minutos. No entanto, este comportamento era

esperado uma vez que para os sistemas com enzima imobilizada existem limitações de transferência de massa que reduzem a velocidade das reações, pelas limitações de difusão e transferência de substratos e produtos através dos poros e membranas do suporte (Nyari, 2013).

Diante destes resultados, e visto que a síntese do suporte polimérico com NS-40116 imobilizada por aprisionamento *in situ* apresenta um procedimento muito mais simples e com menor custo (já que não envolve a utilização de outros componentes, como a dopamina; e requer uma quantidade menor de enzima para uma atividade catalítica elevada, como comprovado pelas concentrações de enzima obtidas nos suportes), optou-se por dar continuidade aos demais ensaios de determinação de constantes cinéticas e de estabilidade apenas com este imobilizado em comparativo à enzima livre.

4.4 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS

As constantes cinéticas foram determinadas para a enzima livre (padrão) e para a enzima imobilizada por aprisionamento *in situ*. A Tabela 5 traz os valores calculados de K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

Tabela 5 – Constantes cinéticas em *p*-NPP da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ*.

Forma	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
Livre	27,98	232,56
PU+Enzima (<i>in situ</i>)	30,33	238,10

Visto que a concentração de enzima no suporte polimérico de PU é praticamente o mesmo que para a enzima livre (31,69 e 35 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente) é possível avaliar os parâmetros cinético com mais clareza. Os valores semelhantes encontrados para o parâmetro cinético $V_{m\acute{a}x}$ tanto da enzima livre quanto da enzima imobilizada indicam que mesmo a enzima estando imobilizada foi capaz interagir com o substrato apresentando comportamento semelhante a enzima livre, ou seja, o processo de imobilização não reduziu a atividade catalítica de enzima. O mesmo comportamento foi verificado para o parâmetro cinético K_m , indicando semelhança na afinidade entre enzima e substrato.

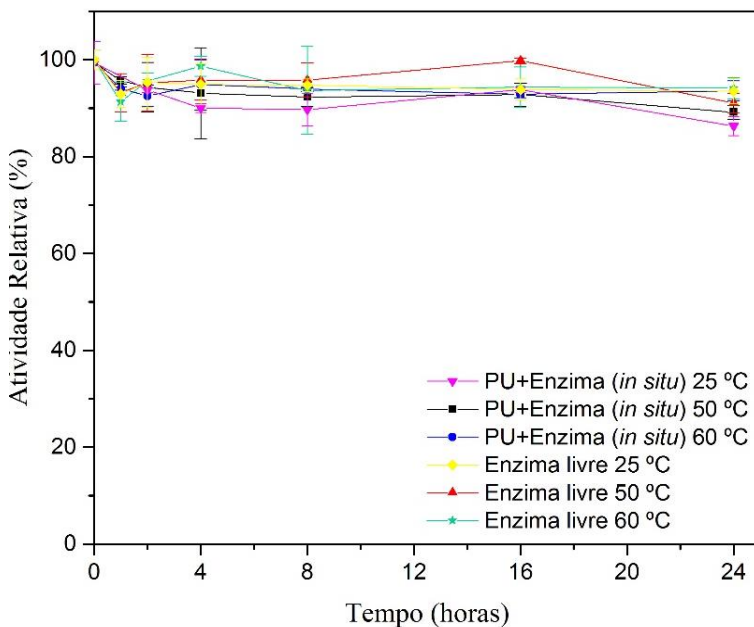
Valores próximos de K_m também foram encontrados nos parâmetros cinéticos do trabalho de Nicoletti et al. (2015) para a imobilização de *Candida antarctica* B (CalB lipase) em espuma de PU. Porém, em seu trabalho houve uma perda grande em termos de $V_{m\acute{a}x}$ quando a enzima foi imobilizada. Inoglu et al. (2008) em seu trabalho de imobilização de glicose oxidase em espuma de PU com emprego de CO_2 supercrítico obteve resultados menores de K_m e maiores de $V_{m\acute{a}x}$ com o emprego de pressões acima da atmosférica. Cui et al. (2013) obtiveram resultados inversos em seu trabalho de imobilização da enzima de *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 em suporte polimérico de poliuretano mostrando um aumento no K_m e redução do $V_{m\acute{a}x}$ das enzimas imobilizadas.

4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE À TEMPERATURA, pH, SOLVENTE E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A fim de avaliar a eficiência do suporte como agente de proteção do biocatalisador, foram realizados estudos relacionados a manutenção da atividade enzimática em relação a estabilidade em diferentes temperaturas, pHs, solventes orgânicos e estabilidade ao armazenamento.

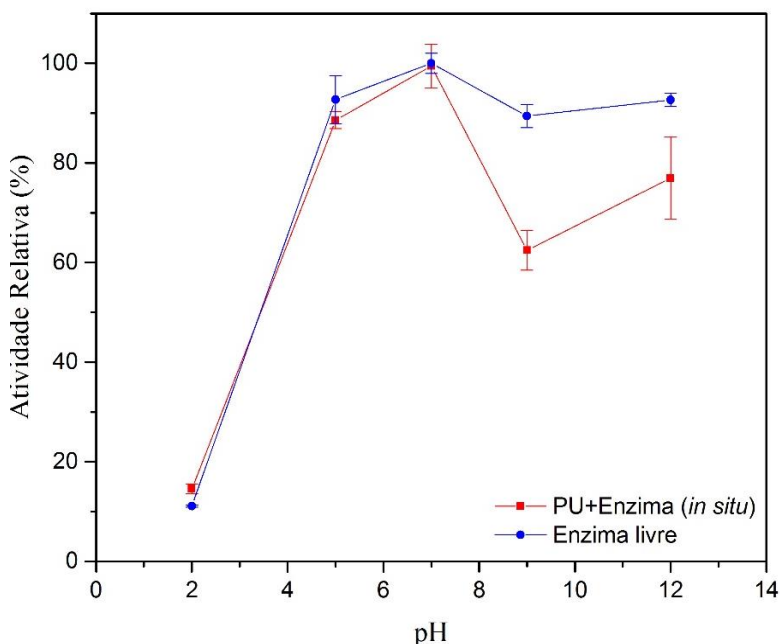
Em relação à estabilidade térmica (Fig. 15), os valores de atividade enzimática encontrados para a enzima livre e para enzima imobilizada foram superiores a 90% durante as 24 horas de ensaio nas diferentes faixas de temperatura avaliada. As semelhanças entre os resultados confirmam mais uma vez que o catalisador enzimático manteve suas características durante o processo de imobilização. Cabe ainda ressaltar que os resultados encontrados neste trabalho foram superiores aos reportados por Cui et al. (2013) para a estabilidade térmica da *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 imobilizada em suporte polimérico de PU, onde após 24 horas de tratamento a atividade relativa da enzima livre caiu para pouco mais de 20% e da enzima imobilizada para pouco menos de 60%. Cipolatti et al. (2015), encontraram resultados similares aos reportados nesse trabalho para a estabilidade de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase em nanopartículas de PU-PEG. O imobilizado apresentou valores de atividade relativa acima de 80% para os ensaios enquanto para a enzima livre este valor chegou próximo aos 60% após 20 horas de tratamento.

Figura 15 – Estabilidade térmica da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ*.



A aplicação industrial da enzima imobilizada, está relacionada com a faixa de pH ótima para seu uso, que está diretamente relacionada com a atividade da enzima. O pH desempenha papel importante no estado de ionização do sítio ativo e mantém a conformação adequada de enzima (CHIARADIA, 2015). Com base nos resultados obtidos (Fig. 16), verificou-se que a enzima imobilizada apresentou comportamento semelhante a enzima livre quando em pH 2,0, 4,0 e 7,0. Além disso, verificou-se que o pH ótimo para enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU foi 7,0. A redução da atividade enzimática da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico quando em pH 9,0 e 12,0 pode estar associado a modificação da estrutura dos poros do polímero levando a redução da atividade enzimática pelas mudanças na estrutura do polímero havendo limitação de transferência de massa durante a medida de atividade.

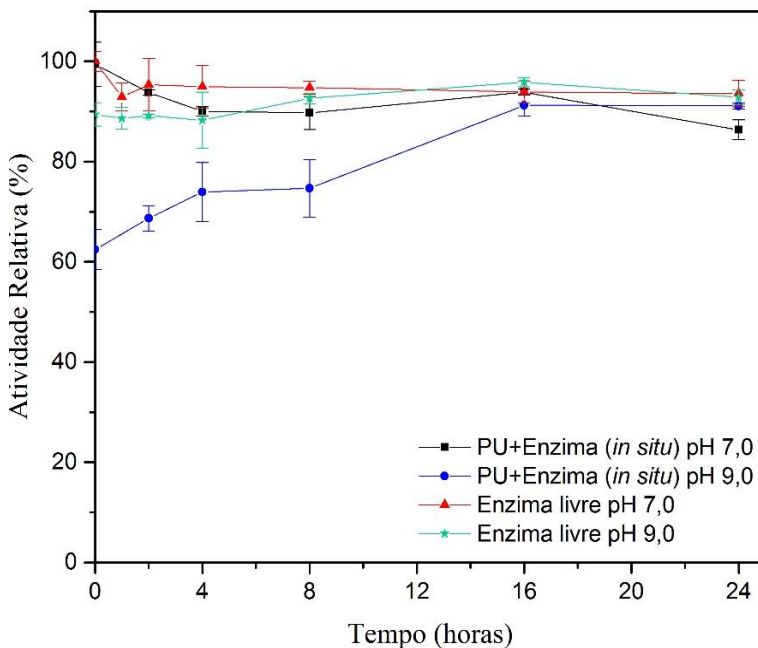
Figura 16 – Efeito do pH na atividade da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ*.



Cui et al. (2013) relataram, ao imobilizar a lipase de *Yarrowia lipolytica* em suporte polimérico de poliuretano, resultados diferentes dos obtidos no presente trabalho. Os autores estudaram o efeito do pH sobre a enzima livre e imobilizada. Valores de 100% de atividade residual foram obtidos em pH 8,0, enquanto que, em pH 6,0 e 9,0 os valores foram inferiores a 50% chegando a próximo de zero para ambas as enzimas.

Diante disso, os pH 7,0 e 9,0 foram selecionados a fim de avaliar a extensão desse comportamento com o tempo. A Figura 17 mostra os valores obtidos para a estabilidade da atividade enzimática em função do tempo para os pH 7,0 e 9,0.

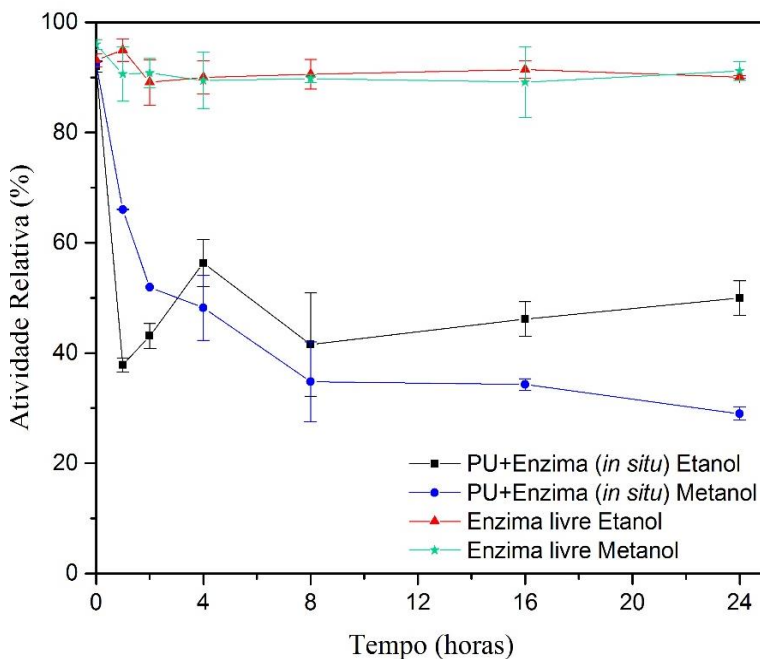
Figura 17 – Estabilidade ao pH da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ*.



A Figura 17 mostra que após 24 horas de contato todas as amostras apresentaram atividade residual acima dos 85% tanto para o pH 7,0 quanto para o pH 9,0. Chiaradia (2015) avaliou a estabilidade ao pH de *Candida antarctica* (CalB lipase) imobilizada em nanopartículas magnéticas de poli(uréia-uretano). Seu trabalho mostrou que a enzima imobilizada foi capaz de manter sua atividade relativa muito próxima de 100% após 6 horas de tratamento quando exposta ao pH 7 e 10.

Na Figura 18 são apresentados os resultados obtidos para a estabilidade da enzima livre e imobilizada quando em contato com metanol e etanol a temperatura ambiente.

Figura 18 – Estabilidade ao solvente da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ*.

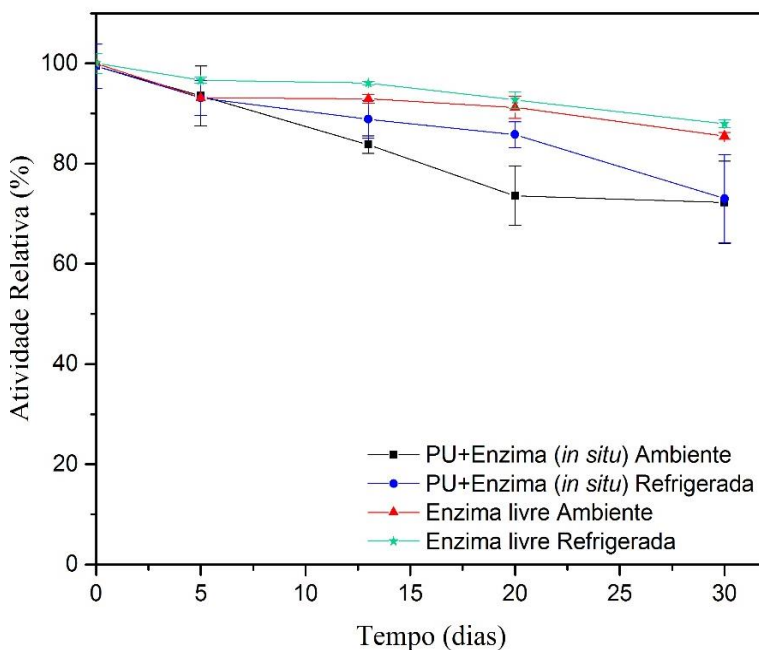


Através dos resultados observou-se uma redução de 60% na atividade enzimática da enzima NS-40116 imobilizada para 30% quando comparada com a enzima livre na mesma condição após 24 horas quando em metanol e redução de 50% após 24 horas quando em solvente etanol. Cabe aqui ressaltar, que os solventes foram escolhidos com base no sistema de produção de biodiesel, sistema esse que pode ser uma aplicação bastante promissora para os imobilizados. Esse comportamento pode estar associado ao efeito negativo do solvente sobre o sítio ativo da enzima ou a remoção da água da superfície da enzima essencial para estabilizar a estrutura tridimensional da mesma. Além disso, a maior atividade residual encontrada para a enzima livre pode ser resultado do rompimento dos agregados de alto peso molecular, tornando um maior número de sítios ativos da enzima acessíveis ao substrato (LAANE et al., 1987; BARON, 2008; PAHJANI et al., 2008).

Na literatura, resultados semelhantes são reportados, como os apresentados por Pahujani et al. (2008) durante o estudo de estabilidade em solventes orgânicos de *Bacillus coagulans* lipase imobilizada em Nylon-6. Após 30 minutos de contato com etanol e metanol a 55 °C as atividades relativas foram de 44% e 46%, respectivamente, comparativamente com a atividade inicial. Wu et al. (2007) avaliaram a estabilidade em solventes orgânicos de *Mucor javanicus* lipase imobilizada em Amberlite XAD-7 por 2 horas a 25 °C, e observaram uma redução na atividade relativa quando em contato com etanol e metanol para 52% e 10%, respectivamente. Baron, 2008 estudou a estabilidade em solventes orgânicos de *Burkholderia cepacia* LTEB11 lipase livre e imobilizada em Accurel EP tratadas por 3 horas a 37 e 50 °C. Para as duas temperaturas a enzima imobilizada apresentou valores bem inferiores (27% a 37 °C e 30% a 50 °C) de atividade relativa em comparação com a livre (100% a 37 °C e 85% a 50 °C) quando em contato com etanol.

Ao final desta etapa, as enzimas livres e imobilizadas foram avaliadas em relação a sua estabilidade em condições de armazenamento, ambiente (25°C) e sob refrigeração (4°C). De acordo com a Figura 19, observa-se que houve uma redução de apenas 20% na atividade catalítica da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU após 30 dias de armazenamento tanto a temperatura ambiente quanto sob refrigeração. Nyari et al. (2016) estudaram a estabilidade ao armazenamento de *Candida antarctica* B (CalB) lipase livre e imobilizada em suporte polimérico de PU a temperatura ambiente e geladeira. O estudo revelou que após 360 dias a atividade enzimática relativa era 87% quando armazenada a temperatura ambiente e 51% quando armazenada sob refrigeração.

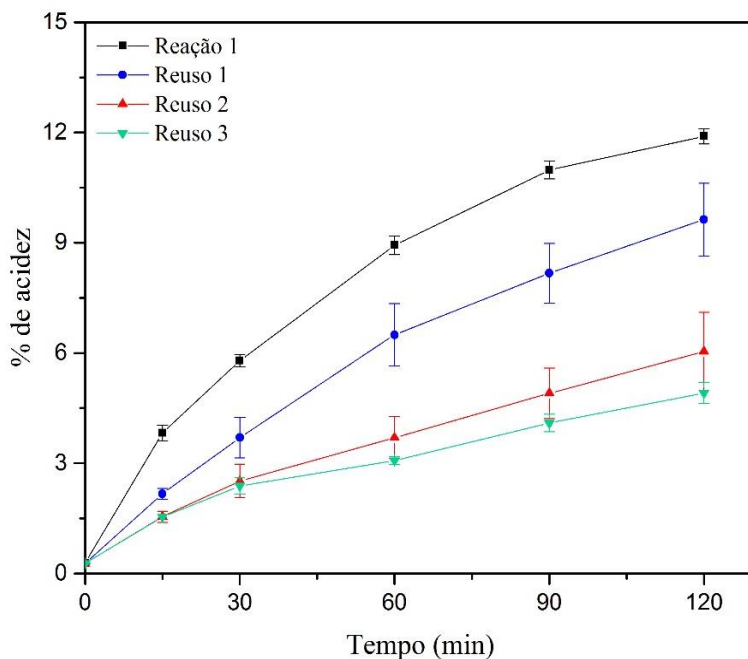
Figura 19 – Estabilidade ao armazenamento da NS-40116 livre e imobilizada em suporte polimérico de PU *in situ*.



4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE REUSO

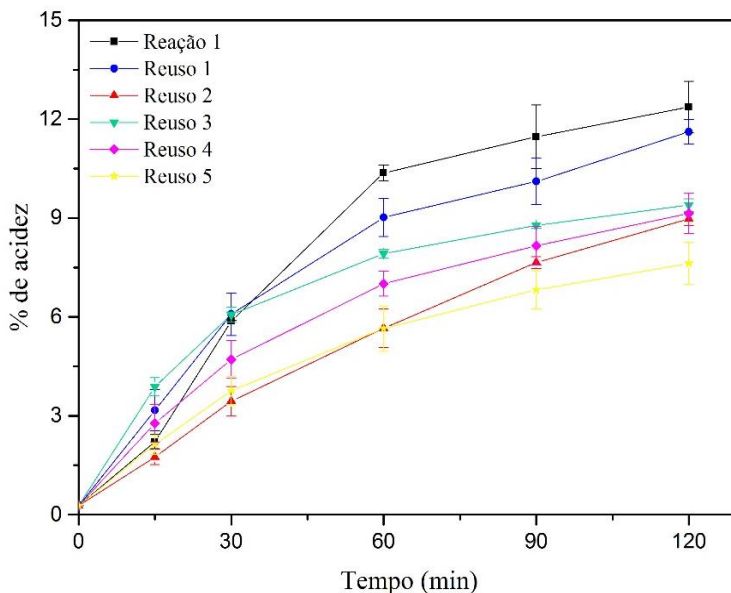
A reutilização de enzimas em mais de um ciclo de reação é um dos principais objetivos dos processos de imobilização, devido principalmente ao alto custo associado as enzimas em muitos processos industriais, reduzindo por vezes sua aplicação como catalizador em aplicação industrial. Normalmente, considera-se que uma enzima pode ser reutilizada até a sua atividade ser maior ou igual a 50% do valor da atividade inicial (FICANHA, 2014). Assim, nesta etapa, foram avaliados os sucessivos ciclos de reuso da NS-40116 imobilizada no suporte polimérico de PU na hidrólise do óleo de soja. A Figura 20 mostra os ensaios de reuso para a enzima imobilizada por ligação química, enquanto a Figura 21 mostra os ensaios de reuso para a enzima imobilizada por aprisionamento *in situ*.

Figura 20 – Avaliação dos sucessivos ciclos de reuso da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico por ligação química.



A quantidade de ciclos de reuso alcançados para a enzima imobilizada por ligação química foi 3, enquanto que a enzima imobilizada por aprisionamento *in situ* chegou a 5 ciclos de reuso, mostrando a importância da imobilização da enzima, permitindo que a mesma permanecesse aderida ao suporte polimérico mesmo após a aplicação na reação, lavagem e novo ciclo de reação, justificando mais uma vez a escolha do método de imobilização por aprisionamento *in situ*. Nicoletti et al. (2015), em seu trabalho de imobilização de *Candida Antarctica B* (CalB lipase) em espuma flexível de PU, conseguiu um resultado de 1 ciclo de reuso para a enzima ligada por adsorção e 4 ciclos de reuso para a enzima imobilizada por aprisionamento antes da atividade relativa ficar abaixo de 50%. O mesmo número de 4 ciclos de reuso foi atingido por Bustamante-Vargas et al. (2015), em seu trabalho de imobilização de pectinase comercial de *Aspergillus niger* em espuma rígida de PU.

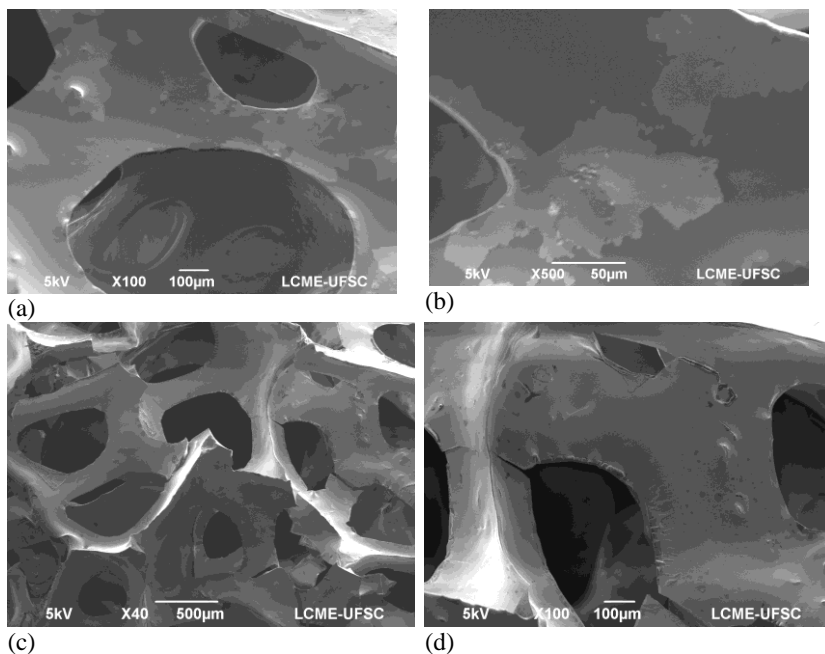
Figura 21 – Avaliação dos sucessivos ciclos de reuso da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ*.



Ao final do processo de reuso, o suporte polimérico foi avaliado novamente em relação a sua morfologia através de microscopia eletrônica de varredura a fim de avaliar mudanças morfológicas. A Figura 17 apresenta as mudanças do suporte polimérico após a aplicação na hidrólise do óleo de soja.

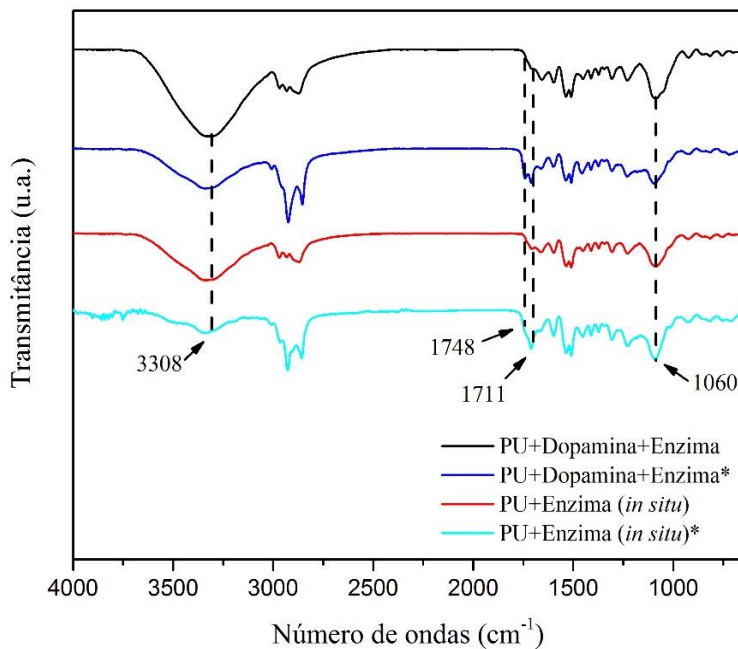
A Figura 22a e 22b revelam uma perda substancial do recobrimento da estrutura do suporte polimérico de PU com enzima imobilizada por ligação química após os ciclos de reuso na reação de hidrólise do óleo de soja o que reflete diretamente na redução da atividade relativa do imobilizado. Já a Figura 22c e 22d mostra que a superfície do suporte polimérico de PU com enzima imobilizada por aprisionamento *in situ* praticamente não sofreu alteração, porém, é possível notar diversos pontos de fratura do suporte o que também tende a refletir diretamente na atividade relativa que o imobilizado passa a oferecer.

Figura 22 – Morfologia do suporte polimérico de PU com enzima NS-40116 imobilizada após os ciclos de reuso em hidrólise do óleo de soja: (a) e (b) imobilizada por ligação química, e (c) e (d) imobilizada por aprisionamento *in situ*.



Para confirmar as mudanças na estrutura química do suporte polimérico análises de FTIR foram realizadas. A partir dos resultados (Figura 23) é possível observar uma redução nas bandas em 1060 cm^{-1} característica da presença de ligações C–NH–C das enzimas (BARNES et al., 2011) e redução da banda na região de 3308 cm^{-1} referente a hidroxila residual (BARNES et al., 2011). Além disso, um incremento das bandas 1748 cm^{-1} e 1711 cm^{-1} correspondentemente à banda de adsorção da carbonila do éster do triglicerídeos e banda de absorção (C=O) dos ácidos graxos livres residuais (MAHESAR, 2014).

Figura 23 – Espectro de FTIR obtido para o suporte polimérico de PU com enzima NS-40116 imobilizada por ligação química e aprisionamento *in situ* após a aplicação na hidrólise do óleo de soja. (*) Após reuso na hidrólise em óleo de soja.



5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 CONCLUSÕES

Diferentes métodos de imobilização foram avaliados para a lipase NS-40116 em suporte polimérico de poliuretano: adsorção, ligação covalente/cruzada utilizando revestimento de glutaraldeído ou dopamina, e aprisionamento *in situ*.

O processo de imobilização que resultou em maior atividade enzimática relativa (em comparação com a enzima livre) foi o aprisionamento *in situ* (99,44%) seguido pelo de ligação covalente/cruzada utilizando revestimento de dopamina (82,84%). Quanto à densidade aparente, o maior valor foi encontrado para o suporte polimérico de PU com enzima imobilizada por aprisionamento *in situ* (0,094 g.cm⁻³). A concentração de enzima no suporte polimérico de PU por aprisionamento *in situ* foi de 31,69 mg.g⁻¹, o qual é muito próximo do encontrado para a enzima na forma livre em caldo.

A aplicação e reuso dos suportes poliméricos com enzima imobilizada na hidrólise do óleo de soja permitiu definir a condição de imobilização em que a interação enzima-suporte é mais forte possibilitando maior número de ciclos de reuso. O suporte polimérico de PU com enzima imobilizada por aprisionamento *in situ* obteve o melhor resultado com 5 ciclos de reuso.

Os valores semelhantes encontrados para o $V_{\text{máx}}$ da enzima livre e imobilizada, 232,56 e 238,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, bem como para o K_m da enzima livre e imobilizada, 30,33 e 27,98 mM, respectivamente, indicam que mesmo a enzima estando imobilizada ela é capaz de apresentar o mesmo comportamento que livre, ou seja, o suporte aparentemente não confere empecilhos para a atividade catalítica da enzima nem mudanças de afinidade entre enzima e substrato.

Com relação à estabilidade à temperatura, o suporte polimérico de PU com enzima imobilizada por aprisionamento *in situ* apresentou comportamento semelhante à enzima livre para as temperaturas avaliadas (25, 50 e 60 °C) mantendo mais de 90% de atividade relativa após 24 horas. O mesmo comportamento foi verificado nos ensaios de estabilidade ao pH (7,0 e 9,0), onde tanto a enzima livre quanto a imobilizada por aprisionamento *in situ* apresentaram valores acima dos 85% após 24 horas.

Portanto, é possível concluir que o método de imobilização por aprisionamento *in situ* utilizando como suporte espuma flexível de

poliuretano, apesar de não ter sido capaz de fornecer ganhos em termos de estabilidade da enzima, permitiu o reuso do sistema por diversos ciclos podendo-se considerar uma alternativa viável na aplicação como biocatalisador em diversas reações.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Avaliar o armazenamento do suporte polimérico de PU com enzima imobilizada em meio aquoso;
- Avaliar diferentes parâmetros de processo para o revestimento com glutaraldeído;
- Avaliar diferentes parâmetros de processo para o revestimento com dopamina;
- Avaliar o uso da enzima NS-40116 dialisada e liofilizada no processo de imobilização por ligação covalente/cruzada;
- Avaliar a aplicação do suporte polimérico de PU com enzima imobilizada na hidroesterificação de óleo vegetal em sistema contínuo e em batelada;
- Estudar o scale up do processo de imobilização e aplicação a nível industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R.; SARDAR, M. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 04, n. 02, 2015.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterisation of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 4, p.313-319, 1999.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - Standard Test Methods for Flexible Cellular Materials—Slab, Bonded, and Molded Urethane Foams – **ASTM D 3574-03**, 2003.

ANTUNES, A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (CalB) *in situ* em espuma flexível de poliuretano de diferentes densidades**. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2015.

BAGAL, D.; KARVE, M. Entrapment of plant invertase within novel composite of agarose–guar gum biopolymer membrane. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p.316-321, jan. 2006.

BARBOSA, A. S.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. Immobilization of lipase by encapsulation in silica aerogel. **Química Nova**, p.969-976, 2014.

BARNES, D. H.; JUGDAOSINGH, R.; KIAMIL, S.; BEST S. M. Shelf Life and Chemical Stability of Calcium Phosphate Coatings Applied to Poly Carbonate Urethane Substrates. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 01, n. 06, 2011.

BARON, A. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. 2008. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1767, p.1073–1101, 2007.

BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, G. D. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p.877-882, ago. 2006.

BRESOLIN, D. **Poliuretanas obtidas em diferentes técnicas de polimerização oriunda de óleo de mamona modificado**. 2014. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BRÍGIDA, A. I. S. **Estudo da imobilização de lipase do tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibras da casca de côco verde como suporte**. 2006. 208 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BROCKMAN, H. L.; MOMSEN, W. E.; TSUJITA, T.. Lipid-lipid complexes: Properties and effects on lipase binding to surfaces. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 6, p.891-896, jun. 1988.

BUENO, T.; FREITAS, L.; CASTRO, H. F. Hidrólise enzimática do óleo de soja empregando lipase pancreática visando a obtenção de ácidos graxos poliinsaturados. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL**, 2., 2005, Varginha. Anais. Varginha, 2005.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; OLIVEIRA, D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. *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, dez. 2015.

CADENA, P. G.; JERONIMO, R. A.; MELO, J. M.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p.1595-1602, mar. 2010.

- CADENA, P. G.; WIGGERS, F. N.; SILVA, R. A.; LIMA FILHO, J. L.; PIMENTEL, M. C. Kinetics and bioreactor studies of immobilized invertase on polyurethane rigid adhesive foam. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p.513-518, jan. 2011.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p.75-80, jan. 2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CHAO, C.; LIU, J.; WANG, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, Y.; XIANG, X.; CHEN, R. Surface modification of halloysite nanotubes with dopamine for enzyme immobilization. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 21, p. 10559-10564, 13 nov. 2013.
- CHEN, Y. Z.; YANG, C. T.; CHING, C. B.; XU, R. Immobilization of lipases on hydrophobilized zirconia nanoparticles: Highly enantioselective and reusable biocatalysts. **Langmuir**, v.24, p. 8877-8884, 2008.
- CHIARADIA, V. **Síntese de nanopartículas magnéticas de poli(ureia-uretano) e aplicação como suporte na imobilização da lipase B de *Candida antarctica***. 2015. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- CHIOU, S. H., WU, W-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups **Biomaterials**, v. 25, p. 197–204, 2004.
- CIPOLATTI, E. P.; VALERIO, A.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B. C. Stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* by crosslinking in PEGylated polyurethane particles by polymerization: Application on fish oil ethanolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p.54-60, ago. 2016.

CIPOLATTI, E. P.; MORENO-PEREZ, S.; SOUZA, L. T. A.; VALERIO, A.; GUISAN, J. M.; ARAUJO, P. H. H.; SAYER, C.; NINOW, J. L.; 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, dez. 2015.

CIPOLATTI, E. P. **Imobilização de lipases em suportes poliméricos**. 2015. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CUI, C.; TAO, Y.; LI, L.; CHEN, B.; TAN, T. Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 91, p.59-66, jul. 2013.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, ago. 2004.

DAVID, A. E.; WANG, N. S.; YANG, V. C.; YANG, A. J. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. **Journal Of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p.395-407, set. 2006.

EMSLEY, J. **Moléculas em exposição**, São Paulo: Edgard Blucher, p. 120-121, 2001.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1996. p.1234.

FAURE, E.; FALENTIN-DAUDRE, C.; JEROME, C.; LYSKAWA, J.; FOURNIER, D.; WOISEL, P.; DETREMBLEUR, C. Catechols as versatile platforms in polymer chemistry. **Progress In Polymer Science**, v. 38, n. 1, p.236-270, jan. 2013.

FERNANDES, I. A. **Estudo da imobilização de lipases utilizando poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) e poliuretano (PU) como suportes**. 2013. 131 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia

de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.

FICANHA, M. M. A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (CalB) pela técnica de sol-gel**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. Monoglicérides: Produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1514–1521, 2008.

FURIGO, A. J. **Enzimas e suas Aplicações Cinética Enzimática**, Disciplina de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, junho 2001.

GEUS, M. **Enzymatic catalysis in the synthesis of new polymer architectures and materials**. Orientado por C.E. Koning. Eindhoven, 2007. 131p. Tese (Doutorado) – Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven, Germany, 2007.

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKIVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOV, N., Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorus containing polyurethanes: application in wax ester synthesis, **Process Biochem**, 46, 923–930, 2011.

GUTIÉRREZ-AYESTA, C.; CARELLI, A. A.; FERREIRA, M. L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 41, n. 1-2, p.35-43, jul. 2007.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coord: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4 ed. São Paulo, 2008.

INOGLU, N.; KAYRAK-TALAY, D.; HORTAÇSU, O. Glucose oxidase immobilization by polyurethane film/foam in dense CO₂ environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 3, p.271-279, mar. 2008.

JAEGER, K. E.; EGGERT, M.T., Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JANG, W. Y.; KRAYNIK, A. M.; KYRIAKIDES, S. On the microstructure of opencell foams and its effect on elastic properties. **Internacional Journal of Solids and Structure**, v. 45, p.1845-1875, 2008

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5-6, p. 307-313, mai. 2003.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p.555-569, abr. 2012.

KAUSHIVA, B. D. **Structure-property relationships of flexible polyurethane foams**. 1999. 251 f. Tese (Doutorado) - Curso de Chemical Engineering, Faculty Of Virginia Polytechnic Institute And State University, Blacksburg, 1999.

KOVALENKO, G. A.; BEKLEMISHEV, A. B.; PERMINOVA, L. V.; MAMAIEV, A. L.; RUDINA, N. A.; MOSEENKOV, S.; KUZNETSOV, V. L. Immobilization of recombinant *E. coli* thermostable lipase by entrapment inside silica xerogel and nanocarbon-in-silica composites. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.98, p.78-86, 2013.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; LIMA, V. M. G.; MITCHELL, D. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

KUMAR, M.; MUKHERJEE, J.; SINHA, M.; KAUR, P.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N.; SINGH, T. P. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP): structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Sustainable Chemical Processes**, v. 3, n. 4, p. 1-10, 2015.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 30, n. 1, p.81-87, jul. 1987.

LAN, Q.; HAUGSTAD, G. Characterization of polymer morphology in polyurethane foams using atomic force microscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 2644-2651, 2011.

LEE, H. DELLATORE, S. M.; MILLER, W. M.; MESSERSMITH, P. B. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. **Science**, v. 318, n. 5849, p.426-430, 19 out. 2007.

LEFEBVRE, L.; KELBER, J.; JIERRY, L.; RITLENG, V.; EDOUARD, D. Polydopamine-coated open cell polyurethane foam as an efficient and easy-to-regenerate soft structured catalytic support (S₂CS) for the reduction of dye. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 1, p.79-85, fev. 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, SP, v. 3, p. 391-394, 2001.

MACHADO, A. C. O. **Obtenção de intermediários quirais utilizando lipases em reatores assistidos por membranas**. 2011. 189 f. Tese (Doutorado) - Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro , 2011.

MACRAE, A. R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 2, p. 291–294, 1983.

- MAHESAR, S. A. KANDHRO, A. A.; KHASKHELE, A. R.; TALPUR, M. Y.; SHERAZI, S. T. H. SB-ATR FTIR Spectroscopic monitoring of free fatty acids in commercially available *Nigella sativa* (Kalonji) oil. **Journal Of Spectroscopy**, v. 2014, p.1-5, 2014.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J.A.V., Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p.1451-1463, mai. 2007.
- MENG, X.; XU, G.; ZHOU, Q.L.; WU, J.P.; YANG, L.R. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilized on nano-sized magnetite particles. **Food Chemistry**, v.143, p.319–324, 2014.
- MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal Of Molecular Catalysis**, v. 3, n. 5, p.371-384, fev. 1978.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2007. 724 p.
- NICOLETTI, G.; CIPOLATTI, E. P.; VALERIO, A.; CARBONERA, N. T. G.; SOARES, N. S.; THEILACKER, E.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, v. 38, n. 9, p.1739-1748, 3 jun. 2015.
- NICOLETTI, G. **Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranyl propionato**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

NYARI, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; STEFFENS, C.; 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, fev. 2016.

NYARI, N. L. D. **Estudo da imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em poliuretano**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.

PAHUJANI, S.; KANWAR, S. S.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2566-2570, mai. 2008.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A.. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.93-99, fev. 2006.

PARDIEU, E.; CHAU, N. T. T.; DINTZER, T.; ROMERO, T.; FAVIER, D.; ROLAND, T.; EDOUARD, D.; JIERRY, L.; RITLENG, V. Polydopamine-coated open cell polyurethane foams as an inexpensive, flexible yet robust catalyst support: a proof of concept. **Chemical. Communications**, v. 52, n. 25, p.4691-4693, 2016.

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M.M.R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p.246-252, jan. 2010.

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M.M.R.; FERREIRA-DIAS, S. Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilised in polyurethane foams. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, n. 2, p.148-158, fev. 2007.

- PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M.M.R.; FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p.327-332, mar. 2009.
- PRICE, J.; NORDBLAD, M.; MARTEL H. H.; CHRABAS, B.; WANG, H.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 113, n. 8, p.1719-1728, 25 fev. 2016.
- RANDALL, D.; LEE, S. **The polyurethane book**. Editora JohnWiley. 2002.
- SANTOS, J. M. B. **Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto (*acrocomia aculeata*) empregando enzima livre**. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R., Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101-115, jul. 1999.
- SHARMA, R.; CHISTY, Y.; BANERJEE, U. C., Production purification, characterization and application of lipases, **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SIENIAWSKA, E. Targeting mycobacterial enzymes with natural products. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 10, p. 1288–1300, 2015.
- SILVA, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina A**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; ROSA, C. D.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. **Food And Bioproducts Processing**, v. 91, n. 1, p.54-59, jan. 2013.

SILVA, J. R. P.; NURNBERG, A. J.; COSTA, F. P.; ZENEVICZ, M. C. P.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; NINOW, J. L. Hidroesterificação de gordura abdominal de frango catalisada pela lipase NS-40116. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, 12., 2016, Caxias do sul. Anais. Caxias do Sul, 2016.

SOARES, S, M. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodisel**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Escola de Engenharia USP, Lorena, 2012.

SOUSA, F. C. A.; SOUZA, E. F.; TERZI, S. C.; BRIGIDA, A. I. S.; PENHA, E. M.; GOTTSCHALK, L. M. F. Hidrólise enzimática do óleo de girassol com lipases comerciais imobilizadas. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, 11., 2015, Fortaleza. Proceedings... . Fortaleza, 2015.

STUARD, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Editora John-Wiley, 2004.

SZYCHER, M. **Szycher'S handbook of Polyurethanes**. Editora Taylor & Francis, 2ª edição, 2013.

VALÉRIO, A.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Preparation of poly(urethane-urea) nanoparticles containing açai oil by miniemulsion polymerization. **Polímeros**, v. 23, p. 451-455, 2013.

VALÉRIO, A.; ROCHA, S. R. P.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Degradable polyurethane nanoparticles containing vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 24-30, 2014.

VESELOVA, I. A.; SHEKHOVTSOVA, T. N. Determination of organomercury compounds using horseradish peroxidase immobilised on a polyurethane foam. **Mendeleev Communications**, v. 9, n. 6, p. 248-249, jan. 1999.

VILAR, Walter. **Química e Tecnologia dos Poliuretanos**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em:

<<http://www.poliuretanos.com.br/Capa/inicial.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

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.

WU, J. C.; LEE, S. S.; MAHMOOD, M. M. B.; CHOW, Y.; TALUKDER, M. M. R.; CHOI, W. J. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p.108-112, abr. 2007.

YILGOR, I.; YILGOR, E.; GULER, I. G.; WARD, T.C.; WILKES, G. L. FTIR investigation of influence of diisocyanate symmetry on the morphology development in model segmented polyurethanes. **Polymer**, v. 47, p. 4105-4114, 2006.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; LEMOS-SENNA, E.; SOLDI, V.; BORSALI, R.; CLOUTET, E. CRAMIL, H. Polyurethane nanoparticle from a natural polyol via miniemulsion technique. **Polymer**, v. 74, p. 8080-8087, 2006.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; LEMOS-SENNA, E.; CRAMIL, H.; CLOUTET, E.; BORSALI, R.; SOLDI, V. The role of surfactant in the miniemulsion polymerization of biodegradable polyurethane nanoparticles. **Materials Science And Engineering: C**, v. 28, n. 4, p.526-531, mai. 2008.

ZENEVICZ, M. C. P. **Hidroesterificação enzimática de óleos de soja e de fritura em sistema de ultrassom**. 2015. 174 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; FURIGO JR, A.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops And Products**, v. 80, p.235-241, 2016.