

Gabrieli Nicoletti

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE B DE *Candida antarctica* EM  
ESPUMA DE POLIURETANO E APLICAÇÃO NA SÍNTESE DO  
ÉSTER GERANIL PROPIONATO**

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge L.  
Ninow

Coorientador: Prof. Dr. Débora de  
Oliveira

Florianópolis  
2014

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

Nicoletti, Gabrieli

Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranil propionato / Gabrieli Nicoletti ; orientador, Jorge Luiz Ninow ; coorientadora, Débora de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2014.

81 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. 3. Espuma de poliuretano. 4. Geranil propionato. I. Ninow, Jorge Luiz. II. de Oliveira, Débora. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranil propionato**

Por

**Gabrieli Nicoletti**

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
**Orientador**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora de Oliveira  
**Coorientador**

---

Prof. Dr. João Borges Laurindo  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Dr<sup>a</sup>. Alexsandra Valério

---

Dr<sup>a</sup>. Claudia Mara Trentin Santin

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manuela Poletto Klein



*“Quando penso que cheguei ao meu limite,  
descubro que tenho forças para ir além.”*

*Ayrton Senna*



## AGRADECIMENTOS

Considero-me uma pessoa privilegiada por chegar até aqui, pelos caminhos que escolhi e pelas oportunidades que me foram concedidas, e para isso devo meu agradecimento àqueles que contribuíram para a realização desta conquista.

A Deus por me iluminar, pela saúde, pelas pessoas que colocou no meu caminho, enfim, por me dar forças para ir além.

A minha família, meus pais, Marcos e Marli, e meu irmão, Marcos Felipe, por acreditar em mim, me motivar, apoiar, incentivar a seguir em frente e aconselhar nos momentos tristes e felizes.

À minha orientadora professora Débora de Oliveira, por acreditar no meu potencial, por toda a dedicação e os conhecimentos repassados e demonstrar como ser uma excelente pesquisadora, obrigada por fazer parte desta conquista.

Ao meu orientador professor Jorge L. Ninow pela confiança, dedicação, incentivo, disponibilidade e momentos de descontração.

À minha amiga, orientadora e colega de trabalho, Eliane, agradeço imensamente a você, pois se cheguei até aqui, foi porque você me incentivou a continuar, me mostrou como realmente era a área da pesquisa, teve a paciência e comprometimento de me ensinar, sinto-me orgulhosa de poder contar com você, enfim, não tenho palavras para te agradecer, você foi essencial. Muito Obrigada!!

Aos meus queridos IC's, Natália, Eron e Nicole, agradeço pela cooperação, pela disponibilidade, paciência, ajuda e colaboração para o desenvolvimento de nossa pesquisa. Gostaria de expressar toda minha gratidão e orgulho de ter feito parte desta equipe.

Aos meus amigos Will, Clarissa, Shanda, Kellen, Camilinha e Dani, por toda amizade, por todos os conselhos, pelas festas que fizemos, por estarem ao meu lado quando eu sempre precisei, por serem minha segunda família, enfim, muito obrigada pela amizade verdadeira.

Ao Seu Ison e Dona Dilce, por me acolherem como filha quando mais precisei, pelas risadas nos momentos felizes e pelo carinho nas horas tristes, por me aconselhar, por exemplos de humildade e caráter e me ajudar a compreender melhor algumas coisas da vida, muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas e amigos do Engebio, obrigada pelo carinho e pela descontração nos momentos de “folga”.

A CAPES e PGEA-UFSC pelo apoio financeiro e de infraestrutura, que permitiu a realização deste trabalho.

Por fim, a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra, perto ou distantes, contribuíram para a realização deste trabalho. Seja pelo apoio em todos os momentos, ou pelos obstáculos impostos, que contribuíram ainda mais para o meu crescimento.

Se hoje eu estou aqui devo muito a vocês. Meu muito obrigado!



Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## **Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranil propionato**

Gabrieli Nicoletti

**Orientador:** Prof. Dr. Jorge Luís Ninow

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora de Oliveira

Lipase B de *Candida antarctica* (CalB) apresenta um papel importante na indústria química e de alimentos. A imobilização desta enzima em um suporte inerte, de baixo custo, que aumente sua estabilidade em diferentes condições de processo, e que permita sua reutilização aparece como uma alternativa aos métodos de imobilização já existentes. Com o objetivo de selecionar o melhor método de interação entre a espuma de poliuretano e a lipase B de *Candida antarctica* (CalB) para aplicação na síntese do éster geranil propionato, diferentes métodos de imobilização foram estudados: adsorção ao suporte (PU-ADS), incorporação ao suporte (PU), ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA). A espuma utilizada como suporte foi produzida com tolueno diisocianato e polioli poliéter (5:3). A caracterização dos derivados enzimáticos imobilizados foi realizada por densidade aparente, microscopia eletrônica de varredura e análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (EITF). A atividade enzimática foi medida por hidrólise utilizando *p*-NPP (*p*-nitro-fenil-palmitato) como substrato. A enzima livre e os preparados enzimáticos foram avaliados em diferentes pHs (5,0; 7,0 e 9,0) por 24 h, e nas temperaturas de 25, 40, 60 e 80 °C por 48 h, e os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) foram avaliados. O derivado com mais alta atividade foi obtida com a imobilização pelo método PU (5,52 U/g). Os métodos que se destacaram em relação às estabilidades e aos parâmetros cinéticos foram o PU e PU-ADS. Os derivados obtidos por estes métodos de imobilização foram avaliados durante 60 dias de incubação e na aplicação na síntese do geranil propionato. Foram obtidas

conversões de 83,5% para PU e 95,9% para PU-ADS, em 24 horas de reação, utilizando óleo de citronela e ácido propiônico como substratos.

**Palavras-chave:** Lipase, espuma de poliuretano, geranyl propionato.

Summary of Master's thesis submitted to the Graduate Program in Food Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), as part of the requirements for the degree of Master in Food Engineering.

## **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate**

Gabrieli Nicoletti

**Advisor:** Prof. Dr. Jorge Luis Ninow

**Co-supervisor:** Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Débora de Oliveira

Lipase B from *Candida antarctica* (CalB) has an important role in chemical and food industry. The immobilization of the enzyme on an inert support, low cost, to increase its stability under different process conditions, and allows their reuse is an alternative to existing methods of immobilization. With the aim of selecting the best method to interact polyurethane foam and *Candida antarctica* lipase B (CalB) to application in the synthesis of geranyl propionate, different methods of Calb immobilization were studied: adsorption (PU-ADS), covalent (using polyethyleneimine) (PU-PEI), ionic exchange (with polyethyleneimine and glutaraldehyde) (PU-PEI-GA) and entrapment (PU). PU foam as support was synthesized using toluene diisocyanate and polyether in a molar ratio 5:3. The characterization of immobilized enzyme derivatives was performed by apparent density, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The enzymatic activity was measured by hydrolysis of p-NPP as substrate. The free enzyme and enzyme preparations were evaluated at different pHs (5.0, 7.0 and 9.0) during 24 h and at temperatures of 25, 40, 60 and 80 °C during 48 h, the kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{m\acute{a}x}$ ) were evaluated. The highest enzyme activity was obtained in PU (5.52 U/g) method. The methods that stood out compared the stabilities and kinetic parameters were the PU and PU-ADS, so these were evaluated during 60 days of storage and application in the synthesis of geranyl propionate. Conversions of 83.5% and 95.9% for PU and PU-ADS were obtained, at 24h reaction, using citronella oil and propionic acid as substrates.

**Keywords:** Lipase, polyurethane foam, geranyl propionate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo da catálise enzimática do mecanismo chave e fechadura proposto por Emil Fischer e modificado por Koshland Jr (KOSHLAND Jr, 1958).....	23
Figura 2- Métodos de imobilização de enzimas (FISCHER, 2010).....	29
Figura 3 - Fórmula estrutural geral do poliuretano. ....	34
Figura 4 - Reação principal de formação do uretano. ....	35
Figura 5 - Esquema representativo das etapas para formação da espuma flexível de PU (VILAR, 2004).....	36
Figura 6 - Reação de esterificação para produção de geranyl propionato. ....	38
Figura 7 - Espuma de poliuretano (EPU).....	42
Figura 8 - Esquema dos métodos de interação CalB- espuma de poliuretano utilizados neste trabalho. Em cor laranja representa a espuma de poliuretano, os círculos azuis a enzima CalB, verde: polietilenoimina e vermelho: glutaraldeído. ....	43
Figura 9 - Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros polioli e isocianato, respectivamente, sendo (a) 5 e 3 mL e (b) 6 e 2 mL.....	49
Figura 10 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (EITF) de <i>Candida antarctica</i> lipase B imobilizada em espuma de poliuretano por diferentes metodologias: por incorporação ao suporte (PU), por adsorção ao suporte (PU-ADS), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA) e enzima livre CalB.....	53
Figura 11 - Fotomicroscopia da espuma de poliuretano utilizada como suporte para a imobilização de CalB.....	55
Figura 12 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano por incorporação ao suporte (PU).....	55

Figura 13 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano imobilizada por adsorção ao suporte (PU-ADS).....	55
Figura 14 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI).....	56
Figura 15 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA).....	56
Figura 16 - Efeito do pH sob a atividade hidrolítica de CalB livre e dos derivados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano por 24 h de incubação.....	57
Figura 17 - Estabilidade em diferentes temperaturas de CalB imobilizada em EPU por diferentes metodologias: por incorporação ao suporte (PU), por adsorção ao suporte (PU-ADS), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA), e enzima livre CalB, por 48 h.....	60
Figura 18 - Estabilidade térmica, CalB imobilizada por incorporação ao suporte (PU), por adsorção ao suporte (PU-ADS) e enzima livre CalB durante 60 dias de incubação. ....	61
Figura 19 - Cromatograma do óleo essencial de citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> ).....	63
Figura 20 - Conversão em geranil propionato utilizando os derivados enzimáticos imobilizados obtidos por incorporação ao suporte (PU) e por adsorção ao suporte (PU-ADS).....	65
Figura 21 - Reutilização da enzima CalB imobilizada por incorporação ao suporte (PU) e por adsorção ao suporte (PU-ADS) na síntese do geranil propionato. ....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais aplicações de lipases em diferentes segmentos... 27	27
Tabela 2 – Efeito do método de imobilização na atividade enzimática (AE) em comparação com a enzima CalB livre..... 50	50
Tabela 3 - Densidade aparente dos derivados imobilizados. .... 52	52
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da lipase livre CalB e dos derivados imobilizados em EPU. .... 59	59
Tabela 5 - Composição química do óleo essencial de citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> )..... 64	64

## NOMEMCLATURAS

PU	Poli (ureia-uretano)
EPU	Espuma de poliuretano
NCO	Isocianato
OH	Hidroxila
EITF	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
PEI	Polietilenoimina
GA	Glutaraldeído
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i>
CLEC	<i>Cross-linked enzymes crystals</i>
CLEAs	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i>
ENGEBIO	Laboratório de Engenharia Bioquímica
EQA	Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 OBJETIVOS .....	21
1.1.1 Objetivo geral .....	21
1.1.2 Objetivos específicos .....	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1 ENZIMAS.....	22
2.2 LIPASES.....	24
2.2.1 Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CalB) .....	25
2.3 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS .....	26
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	28
2.4.1 Métodos de imobilização de enzimas .....	29
2.4.1.1 Adsorção física .....	30
2.4.1.2 Ligação covalente .....	30
2.4.1.3 Ligação iônica.....	31
2.4.1.4 Retenção física em matriz.....	32
2.4.1.5 Retenção física em microcápsula.....	32
2.4.1.6 Retenção física em membranas.....	33
2.4.1.7 Ligação cruzada .....	33
2.4.2 Suportes para imobilização de enzimas .....	33
2.4.2.1 Espuma de poliuretano (EPU) .....	34
2.5 SÍNTESE DE ÉSTERES .....	37
2.6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS .....	39
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 MATERIAL.....	40
3.1.1 Enzima .....	40
3.1.2 Reagentes .....	40



3.1.3 Equipamentos.....	40
<b>3.2 MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Purificação da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CalB) .....	41
3.2.2 Imobilização da lipase de <i>Candida antarctica</i> B (CalB) em espuma de poliuretano (EPU) .....	41
3.2.2.1 Formação da espuma de poliuretano (EPU).....	41
3.2.2.2 Imobilização de CalB em espuma de poliuretano .....	42
3.2.3 Determinação da atividade hidrolítica.....	43
3.2.4 Determinação do conteúdo de proteína .....	44
3.2.5 Caracterização dos derivados enzimáticos imobilizados .....	44
3.2.5.1 Densidade aparente .....	44
3.2.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EITF).....	44
3.2.5.3 Morfologia da enzima imobilizada nos diferentes suportes de espuma de poliuretano .....	45
3.2.5.4 Estabilidade da enzima imobilizada em EPU em diferentes pHs .....	45
3.2.5.5 Determinação dos parâmetros cinéticos .....	45
3.2.5.6 Estabilidade térmica da enzima livre e das enzimas imobilizadas em EPU por 48 horas .....	45
3.2.5.7 Estabilidade térmica da enzima livre e das enzimas imobilizadas em EPU por 60 dias de incubação .....	46
3.2.6 Estudo cinético preliminar da produção enzimática de geranil propionato .....	46
3.2.7 Síntese enzimática do éster geranil propionato .....	46
3.2.8 Quantificação do éster geranil propionato .....	47
3.2.9 Identificação do óleo de citronela e do éster geranil propionato por CG-MS.....	47
3.2.10 Estudo de sucessivos ciclos de uso dos derivados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano (EPU) na síntese de geranil propionato .....	48
3.2.11 Análise estatística.....	48
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
4.1 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE <i>Candida antarctica</i> (CALB) EM ESPUMA DE POLIURETANO (EPU) .....	49
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS	

IMOBILIZADOS EM ESPUMA DE POLIURETANO .....	51
4.2.1 Densidade aparente.....	51
4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EITF) .....	52
4.2.3 Morfologia dos derivados imobilizados de lipase B de <i>Candida antarctica</i> em espuma de poliuretano .....	54
4.2.4 Estabilidade da lipase CalB imobilizada em EPU em diferentes pHs.....	57
4.2.5 Parâmetros cinéticos da lipase CalB livre e dos derivados imobilizados em EPU .....	58
4.2.6 Estabilidade térmica da enzima livre CalB e dos derivados imobilizados em EPU em diferentes temperaturas .....	59
4.2.7 Produção enzimática de éster a partir do óleo essencial de citronela .....	62
4.2.7.1 Composição química do óleo essencial de citronela (Cymbopogon winterianus) .....	62
4.2.7.2 Síntese enzimática de geranyl propionato.....	64
4.2.8 Estudo de sucessivos ciclos de uso dos derivados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano (EPU) na síntese de geranyl propionato.....	66

## **5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS**

<b>FUTUROS .....</b>	<b>68</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	68
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	69
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As lipases são as enzimas mais utilizadas na síntese orgânica, sendo aplicadas em inúmeras preparações comerciais, devido a sua ampla especificidade e maior estabilidade (em comparação com outras enzimas) (KAPOOR; GUPTA, 2012). As lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado global de enzimas. Embora muitas das aplicações industriais destas estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações estão ganhando destaque, com possibilidades de aplicação na indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, couros, polpa de celulose e papel, e no tratamento de resíduos industriais (CASTRO et al, 2004). A lipase B de *Candida antarctica* (CalB) é uma enzima particularmente interessante devido a sua capacidade de catalisar diversas reações, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica, estereoespecificidade e enantiosseletividade (McCABE; TAYLOR, 2004; FORDE et al., 2010).

A busca por processos alternativos para a síntese de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, que não causem ou reduzam os danos ao ambiente, despertou grande interesse dos pesquisadores em todo o mundo. Uma alternativa é a síntese enzimática, que apresenta muitas vantagens em relação à síntese química (LERIN, 2010). A biocatálise é a área que apresenta maior crescimento no mercado industrial de moléculas biologicamente ativas. Estima-se que, até o ano de 2025, cerca de 50% dos processos químicos possam ser substituídos por processos biotecnológicos isolados, ou mesmo pela integração entre catálise enzimática e reações químicas (ANTUNES, 2005).

Com esse avanço da biotecnologia, os diferentes métodos de imobilização de enzimas apresentam-se como uma alternativa atraente, considerando que ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens dos biocatalisadores acaba sendo eliminada e as enzimas podem ser utilizadas em processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos; além de facilitar a recuperação e reutilização da enzima, o que significa um melhor processo de custo-benefício (ZANIN; MORAES, 2004; RODRIGUES et al., 2008; CUNHA et al., 2014).

Há diversos métodos utilizados na imobilização de lipases, incluindo métodos de adsorção (CHEN et al., 2008), ligação covalente (MENG et al., 2014), aprisionamento (KOVALENKO et al., 2013), entre outros. A utilização de um método rápido, fácil, de baixo custo e que apresente resistência a solventes orgânicos aumentaria e facilitaria a

aplicação da CalB. Dentro deste contexto estão as espumas de poliuretano (EPU). EPU é um material inerte, que apresenta excelentes propriedades mecânicas, como alta resistência e elasticidade, grande superfície de adsorção, porosidade elevada, e custo comercial relativamente baixo.

Dentre as reações de interesse das indústrias de alimentos, bebidas, química, cosméticos e farmacêutica, estão os aromas. Neste sentido, métodos biocatalíticos de síntese de ésteres são preferíveis quando comparados com métodos químicos convencionais. A síntese enzimática envolvendo lipases apresenta diversas vantagens, pois pode garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas da ambiente, dependendo da metodologia e da enzima aplicada, o que proporciona produtos de qualidade, com economia de energia e redução da formação de subprodutos. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas convencionais pelas biológicas (CONCERTI et al., 2002; IRIMESCU et al., 2004).

Logo, entre os vários ésteres de importância industrial, o geranil propionato (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-propionato) tem um papel relevante na indústria de alimentos, sendo aplicado em produtos de panificação, sorvetes e gelatinas, entre outros. Este pode ser obtido através do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*), fonte de geraniol, diminuindo, significativamente os custos do processo. A principal vantagem do geranil propionato é ser considerado seguro, possuindo certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FEMA (1965) e é aprovado pelo FDA para uso alimentar (21 CFR 121,1164).

Embora a literatura já apresente estudos no sentido de imobilizar biocatalisadores em espuma de poliuretano, este trabalho traz a comparação de diversos derivados enzimáticos imobilizados com interação enzima-suporte, com o intuito de escolher um método que apresente alta estabilidade, resistência a diferentes condições de processo e que possibilite sua reutilização por vários ciclos na síntese do geranil propionato.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral imobilizar lipase comercial de *Candida antarctica* fração B (CalB) em diferentes suportes de espuma de poliuretano e avaliar a eficiência dos métodos utilizados, para posterior aplicação na síntese do geranyl propionato.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Imobilizar lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano por diferentes métodos de interação enzima-suporte: adsorção ao suporte (PU-ADS), incorporação ao suporte (PU), ligação covalente utilizando revestimento com polietilenoimina (PU-PEI), ligação covalente utilizando revestimento com polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA).
- ✓ Caracterizar a enzima livre e imobilizada através dos diferentes métodos, em relação à temperatura (25, 40, 60 e 80 °C) e ao pH (5,7 e 9);
- ✓ Avaliar os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada nos diferentes métodos propostos;
- ✓ Caracterizar os derivados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano por densidade aparente, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (EITF);
- ✓ Determinar o(s) melhor(es) método(s) de imobilização a partir da caracterização do derivado enzimático;
- ✓ Avaliar a estabilidade do derivado enzimático frente ao armazenamento;
- ✓ Avaliar a aplicação da lipase CalB imobilizada no(s) melhor(es) método(s) na síntese de geranyl propionato;
- ✓ Verificar a capacidade de reutilização das enzimas imobilizadas na reação de síntese do éster.

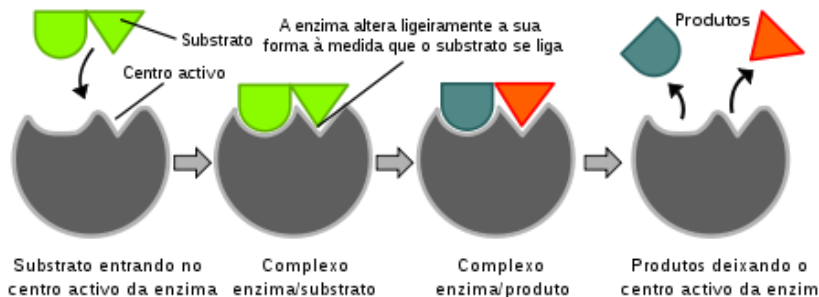
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ENZIMAS

As enzimas têm sido usadas em sua forma nativa há séculos na indústria de alimentos, e mais recentemente, graças a avanços tecnológicos, nas indústrias farmacêutica e química. Hoje em dia, quase mais de 4000 enzimas são conhecidas e destas cerca de 200 são utilizadas em nível industrial (BADGUJAR et al., 2013). Além de serem ativas e versáteis, elas catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores convencionais. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar suplementos. Além disso, toda enzima catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO; PARK, 2003).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (DALLA-VECHIA et al., 2004). A seletividade é decorrência da interação da enzima com substrato (MAMURO et al., 2001). Esta interação é explicada por Emil Fischer em 1894, e o mecanismo do encaixe induzido de Koshland Jr que sugeriu uma modificação ao modelo de chave-fechadura: uma vez que as enzimas exibem estruturas flexíveis, os sítios ativos alteram a sua forma de maneira continuada através de interações com o substrato, enquanto esse mesmo substrato vai interagindo com a enzima. A Figura 1 mostra o modelo da catálise enzimática do mecanismo da chave e fechadura proposto por Emil Fischer e modificado por Koshland Jr (DE CARLI, 2006; KOSHLAND Jr, 1958).

**Figura 1-** Modelo da catálise enzimática do mecanismo chave e fechadura proposto por Emil Fischer e modificado por Koshland Jr (KOSHLAND Jr, 1958).



As enzimas industriais são em sua maioria obtidas de microrganismos (SHARMA et al., 2001). As enzimas microbianas são normalmente mais utilizadas que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos microrganismos em meios de baixo custo. As enzimas microbianas são também mais estáveis e sua produção é mais conveniente e segura. Contudo, apenas cerca de 2% dos microrganismos existentes foram testados como produtores de enzimas (HASAN et al., 2006).

A busca por tecnologias “limpas” e processos mais sofisticados vem estimulando o uso de enzimas em diversos setores industriais pela alta qualidade dos produtos obtidos em função da alta especificidade das enzimas, formando menos subprodutos indesejáveis, e utilizando condições mais amenas de temperatura e pressão (MATOS, 2010).

Em relação ao uso de catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, óxidos e metais, que além de gerar subprodutos indesejáveis, ainda podem apresentar grande dificuldade de separação dos produtos após a reação e necessitar de elevados valores de temperatura e pressão. Apesar de todas as vantagens quanto ao aumento da velocidade de reação, formação de produtos com maior valor agregado, uso de condições mais brandas de processos e serem catalisadores biológicos, o custo das enzimas ainda é muito elevado se comparado aos catalisadores químicos convencionais (BON et al., 1999).

## 2.2 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases), fisiologicamente, são um grupo especial das esterases, pertencem à subclasse 1 das enzimas hidrolíticas de classe 3 sendo designadas como uma sub-subclasse 3.1.1 devido a sua especificidade pelas ligações dos ésteres de ácidos carboxílicos, tendo como função biológica a conversão catalítica de gliceróis em di- ou monogliceróis, ácidos graxos e glicerol (PATIL et al., 2011; STERGIOU et al., 2013). Estes biocatalisadores apresentam importantes aplicações, tais como indústrias de síntese orgânica, produtos farmacêuticos, detergentes, alimentos, panificação, bebidas, cosméticos, couro, papel, tratamento de resíduos, etc. (BADGUJAR et al., 2013).

A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e não requerem cofator (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005), apresentando temperatura ótima entre 30 e 60 °C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (MACRAE; HAMMOND, 1985). Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, isoformas produzidas por um mesmo microrganismo, ou mesmo das condições do ensaio, como pH e temperatura (BATISTELLA, 2011; FREITAS, 2006).

Estas enzimas podem ser produzidas a partir de microrganismos, e especificamente lipases bacterianas desempenham um papel vital em empreendimentos comerciais. As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas, isto porque, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como *Generally Regarded As Safe* (GRAS) (GUTARRA et al., 2005). Estas enzimas também são capazes de catalisar reações de esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (BATTISTELA et al., 2012; KOBLITZ, 2008).

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



proteínas e enzimologia em meios não convencionais, os quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais (CASTRO et al., 2004).

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados na natureza, constituindo o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, devido à versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em larga escala. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas atuais pelas biológicas (HASAN et al., 2006).

### **2.2.1 Lipase B de *Candida antarctica* (CalB)**

A lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CalB) tem atraído muita atenção dos pesquisadores devido a sua alta estabilidade, capacidade de atuação sobre vários substratos e tolerância em meios não aquosos, além de ser estável em pHs ácidos. A CalB é utilizada em uma grande variedade de campos industriais e também está comercialmente disponível na forma livre ou imobilizada através de ligação iônica (Novozym 435) (JUN et al., 2013). A enzima CalB possui uma estrutura globular, apresenta massa molecular de 33 kDa, um ponto isoelétrico de 6 e pH ótimo entre 7 e 8 (BARBOSA et al., 2011). Considerando que o custo da enzima é um fator determinante da viabilidade econômica de biotransformações, a alta termoestabilidade da CalB é uma importante vantagem para reduzir o custo de biocatalisadores e melhorar a viabilidade econômica dos processos (JUN et al., 2013).

Esta enzima não é tão eficiente quantas outras enzimas na hidrólise de triglicerídios, no entanto, é altamente estereoespecífica no sentido da síntese e hidrólise de ésteres, isso ocorre possivelmente devido ao espaço limitado disponível em sua parte hidrofóbica (IDRIS; BUKHARI, 2012), que aparece como uma particularidade desta enzima, que ao contrário da maioria das lipases, não apresenta ativação interfacial, sendo o acesso ao sítio ativo feito por um canal estreito com uma pequena hélice de elevada mobilidade perto deste sítio (JAEGER; REETZ, 1998).

Considerando a importância tecnológica da lipase B de *Candida antarctica*, é de grande valia sua aplicação na forma imobilizada, agregando valor a este biocatalisador, e podendo, assim, melhorar sua estabilidade, possibilitando, ainda, sua reutilização. Esta lipase é

atualmente comercializada pela Novozymes, imobilizada via ligação iônica em resina acrílica (Novozym 435), porém este suporte traz alguns problemas em relação a seu reuso, pois dependendo da reação em que a enzima imobilizada é utilizada, o suporte não resiste e se rompe.

### 2.3 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

A aplicação das lipases como biocatalisadores em processos industriais têm ocorrido em indústrias alimentícias, têxtil, de papel e celulose, detergentes, óleos e gorduras, etc. Assim, esta classe de enzimas vem conquistando uma faixa crescente do mercado com novas aplicações biotecnológicas estabelecidas com sucesso na síntese de biopolímeros e biodiesel, a produção de compostos farmacêuticos enantiopuros, agroquímicos e aromas (*flavour*) (BRIGIDA, 2006; HASAN et al., 2009; KAPOOR; GUPTA, 2012).

Devido às suas características biocatalíticas, as lipases são utilizadas em diversos campos de aplicação. A Tabela 1 sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes segmentos (MARTINS et al., 2008; HASAN et al., 2006), considerando as reações de hidrólise e de esterificação.

Diante dos diversos segmentos para aplicação industrial das lipases, neste estudo destaca-se a síntese enzimática de éster. Neste sentido, os ésteres compõem uma das importantes classes de compostos orgânicos com propriedades aromáticas, podendo ser sintetizados por vários mecanismos. Ésteres obtidos por via enzimática têm sido muito valorizados devido à sua obtenção em condições brandas, podendo ser considerados produtos naturais quando os substratos têm esta origem (IRIMESCU et al., 2004).

Dentro deste conceito que compostos obtidos por catálise enzimática ou por ação microbiana podem ser considerados “naturais”, fato que promove grande aceitação por parte do consumidor, agregando, dessa forma, maior valor aos produtos que utilizam esses aromatizantes produzidos biotecnologicamente (CONCERTI et al., 2002). A imobilização de enzimas torna-se uma estratégia para a maioria das aplicações em grande escala devido à facilidade de reutilização do catalisador, operação contínua e purificação do produto (KIM et al., 2006).

Tabela 1 - Principais aplicações de lipases em diferentes segmentos.

<i>Indústria</i>	<i>Aplicações</i>	<i>Produtos</i>
<b>Hidrólise</b>		
Alimentos	Hidrólise da gordura do leite	Desenvolvimento de "flavour" lácteos
	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, mono diglicerídeos; Reagentes para análise de gordura
Química	Biorremediação	Biossurfactantes
	Tratamento efluente gorduroso	Redução sólidos
Química (detergentes)	Análise de ácidos graxos de TGC	
	Remoção de manchas de gorduras	Detergentes (roupas e superfícies)
Médica	Análise de triglicérides do sangue	Kits de diagnóstico
Farmacêutica, agroquímica	Hidrólise <i>estéreo-específica</i>	Resolução misturas racêmicas
<b>Esterificação</b>		
Química (química fina)	Síntese de ésteres	Compostos quirais intermediários; terapêutico; Ésteres e emulsificantes;
		"Flavour", Fragrância para cosméticos; Agroquímicos, herbicidas.
Alimentos, Química, Farmacêutica	Transesterificação (óleos naturais)	Óleos e gorduras: análogos de manteiga de cacau, Biodiesel
Têxtil	Síntese de poliésteres	Poliésteres biodegradáveis, aromáticos, fibras sintéticas.
Alimentos	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas

Fonte: RIGO et al., 2009.

## 2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A lipase livre não é favorecida em desenvolvimentos industriais devido à sua baixa estabilidade e dificuldade de recuperação. Assim, a imobilização de enzimas em materiais inertes tem atraído atenção, e tem sido largamente utilizada na produção industrial (DONG et al., 2014). Logo, a forma imobilizada permite fácil recuperação e reutilização da enzima, o que significa um melhor processo de custo-benefício (CUNHA et al., 2014).

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (CARVALHO et al., 2006).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo que comprometam a atividade enzimática (DALLA-VECCHIA et al., 2004). A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (FRAMPTON; ZELISKO, 2014).

Para que o emprego de enzimas imobilizadas torne-se um processo economicamente viável, deve-se considerar o tipo de suporte empregado assim como o método de imobilização, que influenciará diretamente na posterior atividade e reuso do biocatalisador (MILETIC et al., 2012; CIPOLATTI et al., 2014). A escolha de um método de imobilização para uma dada enzima depende de fatores essenciais do processo, tais como os substratos utilizados, os tipos de reações e as configurações do reator, exigindo um projeto adequado para atender às necessidades da reação. Um dos principais fatores é a seleção de um suporte adequado para a fixação da enzima. Assim, o método escolhido deve atender a duas necessidades, a catalítica, expressa em produtividade, rendimento, estabilidade e seletividade e a não-catalítica, relativa a controle e *down-streaming process* (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

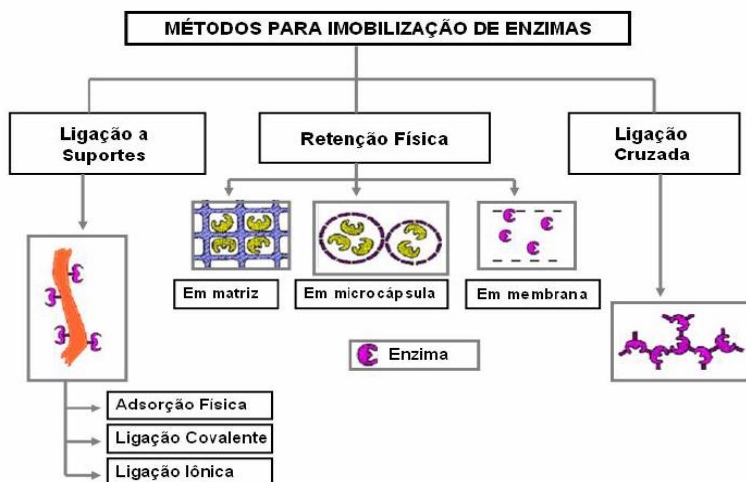
Vários suportes são encontrados na literatura, sendo testados para

a imobilização de enzimas mediante diversas técnicas. A imobilização em suportes sólidos ocorre basicamente de três formas, por adsorção (carvão ativo), ligação covalente (celulose e sílica) ou ligação iônica (celulose), ou ainda, por combinações destas técnicas. A escolha do método vai depender da enzima a ser imobilizada e sua finalidade, ou seja, um importante requisito para imobilização de enzimas é de que a matriz deverá fornecer um ambiente inerte e biocompatível, isto é, não deve interferir com a estrutura nativa da proteína, que, assim, possa comprometer sua atividade biológica (MITCHELL et al., 2002)

### 2.4.1 Métodos de imobilização de enzimas

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização estão: retenção física, que consiste no aprisionamento das moléculas da enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; a imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas (HAIDER; HUSAIN, 2009), conforme pode ser verificado na Figura 2.

Figura 2- Métodos de imobilização de enzimas (FISCHER, 2010).



Embora cada método apresente vantagens e desvantagens, a escolha da estratégia deverá considerar as relações entre suporte-enzima-substrato-solvente orgânico-água, para a manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional das lipases (DALLA-VECCHIA et al., 2004). A interação entre eles irá resultar em um derivado enzimático com propriedades químicas, bioquímicas e mecânicas específicas (TISCHER; KASCHE, 1999).

O desempenho da enzima imobilizada depende em grande parte da estrutura do suporte (MILETIC et al., 2012). Assim, apresenta-se a seguir, de maneira sucinta, algumas técnicas que vêm sendo empregadas para a imobilização de enzimas.

#### **2.4.1.1 Adsorção física**

É o método mais simples e amplamente empregado para imobilização de enzimas. As principais vantagens deste tipo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada e pode ter elevada atividade catalítica. A adsorção da enzima é dependente do pH, da natureza do solvente, força iônica, concentração de enzimas e temperatura. O controle dessas variáveis é requerido para a adsorção otimizada e retenção da atividade, devido à ligação fraca entre suporte e enzima (GAO et al., 2009; RASTIAN et al. 2014).

Na imobilização por adsorção física, a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Tal método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. Porém, apresenta como desvantagem a fácil dessorção da enzima durante sua utilização (CARDOSO et al., 2009).

#### **2.4.1.2 Ligação covalente**

A enzima é covalentemente ligada num suporte ativado através de aminoácidos, tais como os grupos amina de lisina ou arginina, os grupos carboxila do ácido aspártico e ácido glutâmico entre outros. No entanto, os grupos amina das proteínas são as porções mais utilizadas para a imobilização covalente, estando presentes na maioria das

proteínas. Estes grupos são normalmente encontrados na superfície das proteínas e são muito reativos, não havendo necessidade de ativação prévia, para a maioria dos grupos reativos em suportes. Geralmente, a imobilização covalente de enzimas é realizada em três etapas sucessivas: a ativação inicial do suporte, seguido por modificação do suporte ativado e, finalmente, ligação da enzima com o suporte (BUKHARI et al., 2014).

A ligação covalente não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Este método pode também afetar a estrutura nativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (JEGANNATHAN et al., 2008; MATEO et al., 2007; FREITAS et al., 2011).

### **2.4.1.3 Ligação iônica**

Na imobilização por ligação iônica, a enzima se une ao suporte através de atrações eletrostáticas estabelecidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do suporte quanto da enzima (CARDOSO et al., 2009). A principal diferença entre a adsorção física e a ligação iônica é a energia envolvida entre a enzima e o suporte, pois as ligações iônicas são mais fortes do que as forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, porém mais fracas do que a ligação covalente (FERNANDES et al., 2006).

O procedimento deste método é feito da mesma forma que no processo de adsorção física. Como desvantagem, neste método também pode haver a liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio, visto que para este método há total dependência destes. As vantagens são: possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo, simplicidade do método, disponibilidade de suportes, pouca mudança conformacional na enzima, devido ao caráter iônico da ligação e às condições amenas de imobilização, o que conduz à obtenção de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas (WEETALL, 1975).

#### **2.4.1.4 Retenção física em matriz**

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, poliuretano e silanos (SHELDON; PELT et al., 2013; MENDES et al., 2011). Na imobilização em matriz, a enzima está livre em solução, mas com seu movimento restrito por uma rede de gel ou polímero. A enzima é misturada aos componentes que formarão o polímero e, quando esse é formado, a enzima fica presa à matriz. A porosidade da matriz deve evitar a perda de enzima e, ao mesmo tempo, permitir o livre movimento do substrato e do produto (CARDOSO et al., 2009).

A vantagem da encapsulação de enzimas se deve à grande área superficial de contato entre o substrato e a enzima no interior do suporte e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa, porém, existem algumas desvantagens que devem ser levadas em consideração, a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa (SHELDON; PELT et al., 2013; MENDES et al., 2011; DATTA et al., 2013).

#### **2.4.1.5 Retenção física em microcápsula**

A imobilização em microcápsula consiste no preparo de um sistema emulsionado, onde a enzima está confinada no interior de micelas formadas por surfactantes. As enzimas permanecem livres em solução, mas em um espaço restrito (CARDOSO et al., 2009).

Este método de imobilização de enzimas é uma das técnicas mais promissoras, porque pode ser basicamente confinado sem perder a integridade estérica. O tamanho das microcápsulas e as propriedades da membrana são determinados pelos fatores: composição da mistura, concentração dos reagentes, agitação e tempo de reação (LIMA et al., 2001).



#### **2.4.1.6 Retenção física em membranas**

Este método de imobilização consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semipermeável (diâmetro médio de poros da ordem de 200  $\mu\text{m}$ ). Nesse caso não há riscos de desnaturação da enzima, pois não são empregados reagentes químicos. No entanto, as limitações difusionais são intensas (LIMA et al., 2001).

Na imobilização através da retenção física em membranas, uma das principais vantagens é a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. A alta concentração de enzima necessária para garantir esta retenção física na membrana, apresenta-se como desvantagem (MENDES et al, 2011).

#### **2.4.1.7 Ligação cruzada**

A imobilização por ligação cruzada é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi- ou multifuncionais. Como desvantagens do método estão a baixa retenção da atividade e a baixa estabilidade mecânica, que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade (CARDOSO et al., 2009).

Como alternativas ao método convencional foram desenvolvidos os métodos por ligação cruzada utilizando enzimas cristalinas (CLEC - *cross-linked enzymes crystals*) e o método de formação de agregados físicos, por precipitação, e subsequente entrecruzamento (CLEAs - *cross-linked enzyme aggregates*) das enzimas do agregado. O uso dos CLEAs tem atraído a atenção, por sua simplicidade, extensa aplicação, alta estabilidade e preservação da atividade (CARDOSO et al., 2009).

#### **2.4.2 Suportes para imobilização de enzimas**

A seleção da técnica e suporte empregados depende da aplicação a que o biocatalisador se destina. Não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, mas a escolha do suporte dependerá da reação na qual o derivado imobilizado será aplicado, o biocatalisador

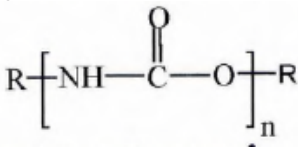
a ser utilizado, e custos envolvidos no processo (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Características desejáveis comuns devem existir para a escolha do suporte a ser utilizado na imobilização de enzimas. Entre elas inclui-se: alta afinidade para proteínas, presença de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e para modificações químicas, hidrofiliçidade, estabilidade mecânica e regenerabilidade (SILVA, 2007).

Inúmeros suportes têm sido apresentados na literatura para imobilização de enzimas, por exemplo, polímeros, materiais inorgânicos, nanopartículas magnéticas, entre outros (JUN et al., 2013; BARBOSA et al., 2011; NETTO et al., 2013; SANTIN et al., 2014; DONG et al., 2014;). Dentre estes destacam-se os polímeros como os poliuretanos, compostos que vêm sendo empregados como suportes enzimáticos devido à sua resistência aos solventes orgânicos (CORREIA et al., 2011). Portanto, ênfase será dada ao suporte utilizado no desenvolvimento deste estudo, a espuma de poliuretano.

#### 2.4.2.1 Espuma de poliuretano (EPU)

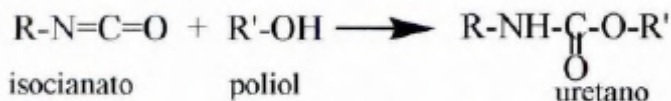
Os poliuretanos são polímeros que contém o grupo uretano em sua cadeia principal (Figura 3). Entretanto, outros grupos como éster, éteres, amida e ureia também estão presentes na cadeia polimérica (VILAR, 2004).

Figura 3 - Fórmula estrutural geral do poliuretano.



Os poliuretanos (PUs) são formados pela reação de adição entre um isocianato, composto que contém o grupo  $[-\text{N}=\text{C}=\text{O}]$  e um hidrogênio ácido ( $\text{H}^+$ ) existente. A reação de adição ocorre através da dupla ligação  $\text{C}=\text{N}$ , sendo a reação mais importante a que ocorre entre um isocianato e um composto que contenha o grupo  $-\text{OH}$  (hidroxila), formando ésteres carbâmicos, denominados uretanos (Figura 4) (CADENA et al., 2010; MATSUI, 2007).

Figura 4 - Reação principal de formação do uretano.



Segundo Shelke et al. (2014), poliuretanos (PU) têm recebido cada vez mais atenção, devido a sua versatilidade, apresentando propriedades mecânicas e biológicas muito diferentes, e por ser considerado um dos materiais mais biocompatíveis. Merece destaque também por sua durabilidade, flexibilidade e bioestabilidade, o que o torna interessante na aplicação como carreador de fármacos, engenharia de tecidos e desenvolvimento de dispositivos médicos. Esta tecnologia pode ser considerada promissora para uso como suporte para imobilização de enzimas em reações em meios orgânicos, considerando que estes possuem propriedades únicas tais como a resistência a óleos, solventes e gorduras (GUNCHEVA et al., 2011).

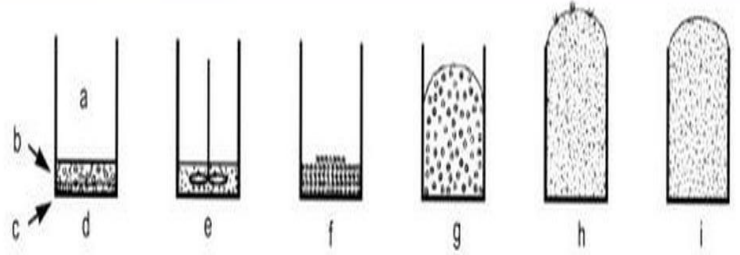
A espuma de poliuretano (EPU) é um material inerte, que tem sido utilizado na imobilização de enzimas de maneira eficiente (PIRES-CABRAL et al., 2007; SILVA et al., 2013; SANTIN et al., 2014). Essa espuma é resultante da condensação de policianatos (R-CNO) e polióis (R-OH). Após a polimerização, o dióxido de carbono escapa da matriz, formando poros. Tipicamente, as matrizes porosas de poliuretano não só aumentam as áreas de superfície, mas também minimizam a limitação por difusão entre substrato e produto (SILVA et al., 2013).

A Figura 5 mostra as etapas de polimerização da espuma flexível de poliuretano, onde pode ser visualizada a nucleação e o crescimento da espuma. Inicialmente, durante a etapa de agitação, ocorre a mistura do ar com os ingredientes líquidos. Comumente, estes preparados contêm surfactante de silicone, o qual reduz a tensão superficial, resultando numa maior superfície para uma dada quantidade de energia fornecida ao sistema (Figura 5e). Este processo é chamado de nucleação (VILAR, 2004). Essas bolhas de gás são geradas através de toda a massa fluida, que remanescem como poros no resfriamento e dão origem a uma estrutura esponjosa (CALLISTER, 1991).

A imobilização de enzimas em espumas flexíveis de poliuretano aparece como um método simples, que pode aumentar a atividade, estabilidade e principalmente o reuso das enzimas, devido às propriedades mecânicas inerentes ao suporte formado, apresentando uma influência positiva nos custos do processo (OZDEMIR et al.,

2009).

Figura 5 - Esquema representativo das etapas para formação da espuma flexível de PU (VILAR, 2004).



a) ar; b) polioli, água e aditivos; c) isocianato; d) matérias-primas; e) mistura e nucleação; f) creme e início do crescimento; g) crescimento; h) separação de fase, suspiro e gelificação; i) cura.

Etapas	Mistura	Creme	Crescimento	Suspiro	Cura e pós cura
Tempo	0	10 s		60 s	horas a dias
Fenômenos físicos	dispersão das bolhas e reagentes	mudança de cor	aumento da viscosidade	abertura das células aumento do módulo	aumento do suporte de carga
Fenômenos cinéticos	colisões das moléculas	reação água + isocianato		reação polioli + isocianato e aumento do peso molecular	difusão
Morfologia		expansão das bolhas	formação dos domínios rígidos	precipitação da poliuréia	ruptura da membrana das células

## 2.5 SÍNTESE DE ÉSTERES

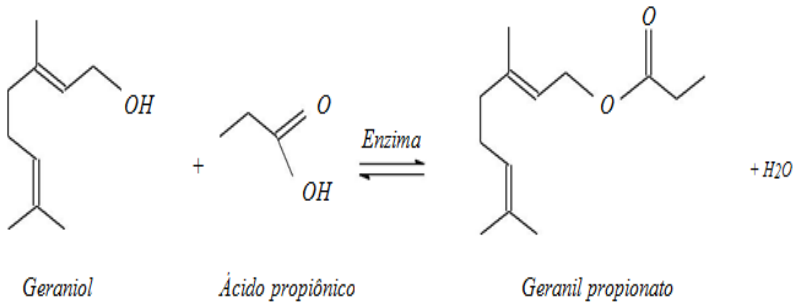
A produção de aromas e fragrâncias através de substâncias naturais como matérias-primas está sob intenso desenvolvimento ao longo das últimas três décadas. O uso desses substratos associados à utilização de enzimas imobilizadas pode favorecer economicamente o processo, devido ao baixo custo associado aos substratos e capacidade de reutilização do derivado imobilizado. Embora a síntese química ainda supere a utilização de enzimas, há uma demanda pelo consumo de produtos “naturais”, característica que vem adquirindo cada vez maior importância para os consumidores, impulsionando a produção de ésteres de aromas por via biotecnológica. Com base no exposto, a biocatálise deve representar uma alternativa potencial para a síntese química (CHIARADIA et al., 2012; PAROUL et al., 2012).

A esterificação para produção dos ésteres aromáticos ocorre a partir da adição de um álcool com ácido na presença do catalisador (lipase), com eliminação de água. Ésteres de cadeia curta são compostos amplamente distribuídos na natureza e são os principais componentes de cosméticos, aromas em alimentos, perfumes, e indústria farmacêutica, devido ao seu aroma natural (KUPERKAR et al., 2014).

O geraniol é um dos principais constituintes de vários óleos essenciais, tais como rosas e citronela e também é presente em concentrações mais baixas de gerânio, limão e várias outras essências (PAROUL et al., 2010). Este álcool pode ser obtido através do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*), diminuindo, significativamente os custos do processo, considerando que 25 g de geraniol custam R\$174,00 (Sigma-Aldrich) e 25 g de óleo de citronela R\$ 8,50 (Extrato Vital, farmácia local, Florianópolis/SC).

A partir do geraniol pode ser obtido o geraniol propionato (trans-3,7-dimetil-2,6-octadieno-1-propionato) (Figura 6), que merece destaque dentre os vários ésteres de importância industrial, apresentando um relevante papel na indústria de alimentos, sendo aplicados em balas, produtos de panificação e gelatinas. Além de possuir ampla aplicação na indústria de cosméticos e farmacêutica. A principal vantagem do geraniol propionato é ser considerado seguro, possuindo certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FEMA (1965) e é aprovado pelo FDA para uso alimentar (21 CFR 121,1164).

Figura 6 - Reação de esterificação para produção de geranyl propionato.



## 2.6 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Com base no exposto ao longo deste capítulo, pode-se verificar o crescimento do interesse pela imobilização de enzimas nas últimas décadas, tendo como causa principal o seu largo potencial em aplicações industriais. Enzimas imobilizadas, idealmente, devem ser recuperadas e reutilizadas facilmente, o que significa um melhor processo de custo-benefício.

Nesse contexto, vários suportes são relatados no estudo da imobilização de enzimas visando aumentar a sua estabilidade para aplicação em processos industriais, dentre estes o poliuretano. A utilização de espumas de poliuretano para imobilização de enzimas tem sido reportada com sucesso em estudos como o de Cui et al. (2013) e Silva et al. (2013).

Levando em consideração estes aspectos, este trabalho visa o estudo da imobilização de lipase de *Candida antarctica* fração B em espuma de poliuretano, avaliando diferentes métodos de interação enzima-substrato. Embora trabalhos como o do Cui et al. (2013) já tenham demonstrado a eficácia deste tipo de imobilização para outra lipase, o presente trabalho apresenta uma análise mais ampla da utilização deste suporte, também utilizado aqui como base para imobilização de lipase por confinamento. Além disso, também será descrita a caracterização dos suportes utilizados, bem como dos derivados obtidos, o que torna ainda mais interessante para posterior aplicação.

O derivado devidamente caracterizado será aplicado na síntese do éster aromático geranil propionato, o qual apresenta importância na aplicação industrial, por ser desenvolvido por uma fonte alternativa, ou seja, substratos naturais como o óleo de citronela, apresentando diversas aplicações na indústria de alimentos, como em produtos de panificação, sorvetes e gelatinas. Logo, a aplicação de CalB imobilizada em espuma de poliuretano na síntese de geranil propionato a partir do óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus*) aparece como uma alternativa viável, podendo embasar outros trabalhos na área e futura aplicação em larga escala.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos o material e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental deste trabalho, relacionado à imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do geranyl propionato. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) e na Central de Análises, do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Enzima

A lipase *Candida antarctica* B (Novozymes NZL-102, CalB), na forma líquida, foi gentilmente cedida pela empresa Novozymes Latin América Ltda (Araucária-PR).

##### 3.1.2 Reagentes

- Etanol (Sigma-Aldrich,  $\geq 99,5\%$  pureza);
- Ácido propiônico (Sigma-Aldrich,  $\geq 98,5\%$  pureza);
- Hexano  $C_6H_{14}$  (Sigma-Aldrich,  $\geq 98,5\%$  pureza);
- Diclorometano -  $CH_2Cl_2$  (Sigma-Aldrich, 99,5% pureza).
- *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) (Sigma-Aldrich);
- Óleo essencial de citronela (Farmácia Extrato Vital);
- Tolueno diisocianato (TDI) (Manne Ltda/ Guaramirin-SC);
- Polioli poliéter (Mannes Ltda/Guaramirin-SC).

##### 3.1.3 Equipamentos

Dentre os equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, pode-se citar:

- Liofilizador (LIOTOP, modelo L101);
- Balança Eletrônica de Precisão GEHAKA BG 200;
- Balança Analítica DIGIMED KN 500;



- Estufa 502 ORION<sup>®</sup>, marca FANEM<sup>®</sup> São Paulo - Brasil;
- pHmetro digital 827 pH lab, marca METROHM Swissmade;
- Dessecador;
- Incubadora shaker com agitação orbital MA 410/CFT, marca MARCONI, 220 volts, 700 watts.
- Banho termostatzado com shaker marca DUBNOFF;
- Rota-evaporador acoplado com bomba a vácuo e banho termostatzado;
- Freezer modelo Electrolux RE28, 220 volts;
- CG/FID Shimadzu modelo 2010, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-Wax.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Purificação da lipase B de *Candida antarctica* (CalB)

A lipase comercial CalB (obtida da Novozymes) apresentava-se dissolvida em sorbitol, sendo necessária purificação prévia. A etapa de purificação consistiu na diálise da lipase comercial CalB com tampão fosfato 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) por 24 h. Após a purificação, a enzima foi liofilizada por 24 h e armazenada sob refrigeração para posteriores análises.

### 3.2.2 Imobilização da lipase de *Candida antarctica* B (CalB) em espuma de poliuretano (EPU)

#### 3.2.2.1 Formação da espuma de poliuretano (EPU)

A espuma foi formada a partir da reação de 3 mL de tolueno diisocianato (TDI) formado da mistura dos isômeros 2,4 e 2,6 nas proporções 80/20 (TDI 80/20) e 5 mL de polioli poliéter, em uma razão molar de NCO:OH 2:1.

Os monômeros foram adicionados a um copo plástico, que permitiu a melhor retirada da espuma após o término da reação. A reação foi realizada em banho de gelo sob agitação manual (SILVA et al., 2013). Após a formação da espuma, esta foi cortada (5 mm x 5 mm x 5 mm), e submetida a temperatura ambiente (CUI et al., 2013). A

Figura 7 mostra uma espuma de poliuretano utilizada como suporte neste trabalho.

Figura 7 - Espuma de poliuretano (EPU).



### 3.2.2.2 Imobilização de CalB em espuma de poliuretano

Para imobilização de CalB em espuma de poliuretano foram utilizados 4 métodos, descritos a seguir (Figura 8):

(1) Enzima imobilizada por adsorção ao suporte (PU-ADS): a adsorção da enzima foi realizada por imersão da espuma em uma solução lipolítica (30 mg/mL) a 15 °C em agitador orbital durante 2 h. O imobilizado resultante foi seco em estufa a 40 °C por 24 h e após armazenado a 4 °C (adaptado de CUI et al., 2013);

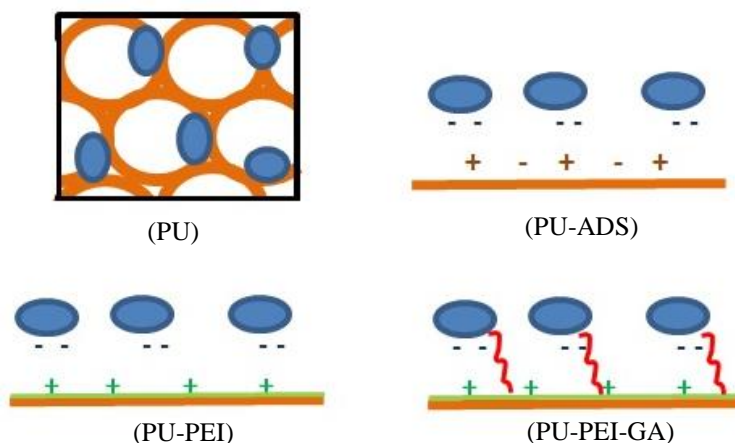
(2) Enzima imobilizada por troca iônica (PU-PEI): a espuma de poliuretano foi recoberta com uma solução de 0,2% de polietilenoimina (PEI) (m/v) (25000 Da, linear) por 2 h a 35 °C e lavada com água destilada para remoção do excesso de PEI. O EPU recoberto com PEI foi seco em estufa a 40 °C por 24 h e armazenado a 4 °C. A enzima foi imobilizada seguindo o método descrito em (1) (CUI et al., 2013);

(3) Enzima imobilizada por ligação covalente (PU-PEI-GA): neste método, a espuma de poliuretano recoberta com PEI foi ativada com solução 0,5% de glutaraldeído (GA) (m/v) a 35 °C por 2 h e lavada

com água destilada para remover o excesso de GA. Após, a enzima foi imobilizada covalentemente utilizando o método descrito em (1) (CUI et al., 2013).

(4) Enzima imobilizada por incorporação ao suporte (PU): neste método a enzima CalB liofilizada (30 mg/mL) foi adicionada ao polioli poliéter, em banho de gelo, em seguida o tolueno diisocianato (TDI) foi adicionado. A espuma formada foi seca em estufa a 40 °C por 24 h e então armazenada a 4 °C (SILVA et al., 2013).

Figura 8 - Esquema dos métodos de interação CalB- espuma de poliuretano utilizados neste trabalho. Em cor laranja representa a espuma de poliuretano, os círculos azuis a enzima CalB, verde: polietilenoimina e vermelho: glutaraldeído.



### 3.2.3 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática foi medida pela hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) 0,5% em etanol, como substrato. Foram realizados os ensaios com os preparados enzimáticos e com a enzima livre, pesando 200 mg e 100 mg, respectivamente. Após a pesagem de ambos, preparados enzimáticos e enzima livre, foi adicionado 1 mL do substrato e 1 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0. E então, seguiu para incubação em banho termostatizado a 30 °C por 5 min, e a reação foi

interrompida com 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . O aumento da absorbância a 410 nm, causada pela liberação do *p*-nitrofenol na hidrólise do *p*-NPP, foi medida espectrofotometricamente UV-Vis (CHIOU e WU, 2004).

### 3.2.4 Determinação do conteúdo de proteína

A determinação de conteúdo de proteína foi realizada de acordo com método proposto por Bradford (1976), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino.

As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, da adição de 0,1 mL de amostra a 5 mL do reagente de Bradford.

### 3.2.5 Caracterização dos derivados enzimáticos imobilizados

#### 3.2.5.1 Densidade aparente

A densidade aparente foi avaliada de acordo com metodologia descrita pela American Society for Testing and Materials (ASTM) na norma ASTM D 3574-03. A medida das amostras foi realizada com o auxílio de um paquímetro. O corte teve dimensões de 5x5x5 mm. Após foi verificado o peso, em balança digital com precisão de 0,0001 g, capacidade de 200 g (GEHAKA, BG 200). O valor calculado é expresso em g/cm<sup>3</sup>. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.2.5.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EITF)

As análises de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EITF) do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* foram realizadas em aparelho modelo Tensor 27, da marca Bruker, no Laboratório de Materiais da UFSC (Labmat). As amostras foram analisadas no modo de refletância total atenuada (ATR), com ponteira de diamante e foram analisadas por transmitância na região de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras. Os dados foram tratados pelo software do equipamento, e após plotados no Origin.

### **3.2.5.3 Morfologia da enzima imobilizada nos diferentes suportes de espuma de poliuretano**

A morfologia do suporte e das enzimas imobilizadas foi verificada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) JEOL JSM-6390LV. As espumas foram cortadas e fixadas com fita de carbono, em um suporte e recobertas com ouro. A magnitude utilizada foi de 27, 30 e 100 vezes. As análises de MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A análise do tamanho médio das partículas foi realizada com o auxílio do software Size Meter 1.1.

### **3.2.5.4 Estabilidade da enzima imobilizada em EPU em diferentes pHs**

A enzima CalB livre e imobilizada nos métodos propostos em espuma de poliuretano (EPU) foram mantidas em diferentes pHs por 24 h à temperatura ambiente. Foi utilizado tampão fosfato 50 mM (pH 7,0); tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e tampão Tris-HCl 50 mM (pH 9,0), e então, a atividade enzimática foi avaliada, conforme descrito no item 3.2.3.

### **3.2.5.5 Determinação dos parâmetros cinéticos**

As constantes cinéticas foram determinadas utilizando como substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM) na atividade enzimática, possibilitando a determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) pelo sistema gráfico de Lineweaver & Burk. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram calculados para os derivados imobilizados e para enzima livre.

### **3.2.5.6 Estabilidade térmica da enzima livre e das enzimas imobilizadas em EPU por 48 horas**

A enzima CalB livre e imobilizada nos diferentes métodos propostos em espuma de poliuretano (EPU) foram mantidas a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) e incubadas em estufa a

40, 60 e 80 °C durante 48 horas, e então, a atividade enzimática foi avaliada conforme descrito no item 3.2.3.

### **3.2.5.7 Estabilidade térmica da enzima livre e das enzimas imobilizadas em EPU por 60 dias de incubação**

Os métodos de imobilização considerados promissores, em termos de atividade enzimática, estabilidade e parâmetros cinéticos (PU e PU-ADS), foram avaliados em relação à estabilidade térmica ao longo de 60 dias de incubação nas temperaturas de 25, 40, 60 e 80 °C, e a atividade enzimática foi avaliada conforme apresentado no item 3.2.3.

### **3.2.6 Estudo cinético preliminar da produção enzimática de geranil propionato**

A fim de avaliar o tempo de reação para a síntese do geranil propionato nos melhores métodos de imobilização (PU e PU-ADS), foram consideradas as condições otimizadas de Paroul et al. (2012), em relação às variáveis estudadas no processo enzimático. Óleo de citronela e ácido propiônico na razão molar de 5:1 (m/m) foram utilizados como substratos na esterificação enzimática. Os outros parâmetros mantidos constantes foram: 5 % (m/v) de concentração da enzima e 60 °C. Os tempos avaliados foram 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas.

### **3.2.7 Síntese enzimática do éster geranil propionato**

Após definir os melhores métodos de imobilização (PU e PU-ADS), as reações de esterificação foram aplicadas para síntese do geranil propionato, nas condições experimentais descritas no item 3.2.6, utilizando um volume reacional de 10 mL. O óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus*) foi utilizado como fonte de geraniol. Os ensaios foram realizados a 60 °C em shaker com agitação orbital de 150 rpm, por 24 horas (tempo determinado pelo estudo cinético, item 3.2.6), conforme condições estudadas por Paroul et al. (2012). Após o término do tempo de reação, o biocatalisador foi filtrado em papel filtro e utilizado solvente orgânico para uma maior remoção do geranil propionato aderido ao suporte da enzima e nas paredes dos frascos. As

amostras foram evaporadas a vácuo por 10 min a 40 °C. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração, para posterior análise.

### 3.2.8 Quantificação do éster geranil propionato

A quantificação do éster geranil propionato foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm ID x 0,25  $\mu\text{m}$  df), detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40 °C (2 min), 40 a 180 °C (6 °C/min), 180 - 230 °C (20 °C/min), 230 °C (5 min), temperatura do injetor 250 °C, detector a 250 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste  $\text{N}_2$  (56 kPa), volume injetado 1,0  $\mu\text{L}$  de amostra diluída em diclorometano (2:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante geraniol.

### 3.2.9 Identificação do óleo de citronela e do éster geranil propionato por CG-MS

A identificação dos compostos presentes no óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) e do éster geranil propionato foram analisados através de injeção de 1  $\mu\text{L}$  da fase orgânica em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) da Shimadzu modelo QP2010, equipado com coluna Rtx®-1 MS (Crossbond® 100% dimetil polisiloxano) de 30 m de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. As condições de operação foram: temperatura da coluna de 80 °C por 2 min, taxa de aquecimento 10 °C  $\text{min}^{-1}$  até 140 °C com taxa de aquecimento 3 °C  $\text{min}^{-1}$  até 200 °C mantida por 10 min, com taxa de aquecimento de 5 °C  $\text{min}^{-1}$  até 230 °C, com taxa de aquecimento de 20 °C  $\text{min}^{-1}$  até 300 °C mantida por 0,83 min; temperatura do injetor: 280 °C, injeção no modo Split; temperatura da interface: 260 °C; hélio foi empregado como gás de arraste, com fluxo de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$ . Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas operando na forma *scan* com varredura de 40 a 400 de massa carga; voltagem do filamento de 70 eV; voltagem do detector de 1,3 KV; analisador do tipo quadrupolo, em um tempo de análise de 48,33 min. Os compostos presentes no óleo essencial de citronela e o éster foram identificados com 97 a 93% de

similaridade quando comparados com os espectros de massas da biblioteca NIST 05.

### **3.2.10 Estudo de sucessivos ciclos de uso dos derivados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano (EPU) na síntese de geranil propionato**

Para o teste de reuso da enzima foram consideradas as seguintes condições: razão molar de 5:1 óleo de citronela e ácido propiônico, temperatura 60 °C, 5 % (m/v) de enzima em relação à massa total de substratos, tempo reacional 24 h e agitação 150 rpm. A enzima recuperada foi filtrada e lavada com 30 mL de hexano para retirar os resíduos remanescentes da reação. Após, o derivado enzimático foi mantido em estufa a 40 °C por 1 h. A enzima recuperada foi novamente utilizada na síntese do geranil propionato, e assim, sucessivamente até observar um declínio na conversão.

### **3.2.11 Análise estatística**

Todas as análises foram realizadas em triplicatas, e analisadas utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc, USA).



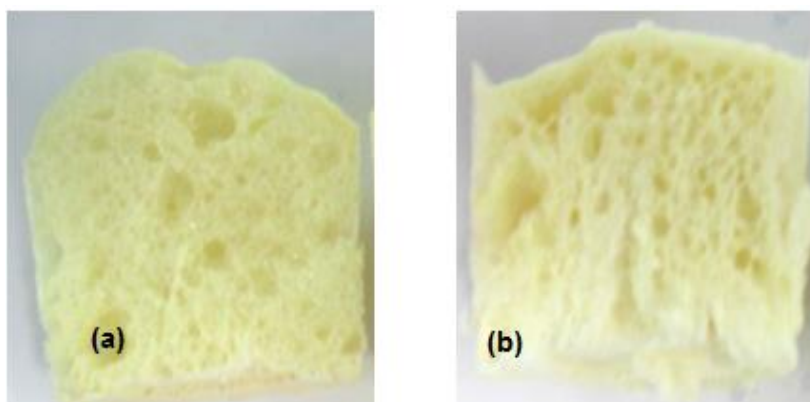
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa, referentes à imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e posterior aplicação do derivado enzimático na síntese do éster geranil propionato. A influência da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada, capacidade de ciclos reacionais e características dos suportes e dos imobilizados estão apresentados.

### 4.1 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica* (CALB) EM ESPUMA DE POLIURETANO (EPU)

A proporção a ser utilizada de polioli e isocianato foi determinada com base nos resultados obtidos por Fernandes (2013). Conforme ilustra a Figura 9, as proporções estudadas foram de 5:3 e 6:2 (polioli: isocianato). A proporção 6:2 conduziu à formação de uma espuma com grandes poros, tornando-se inadequada para esse trabalho. Já a proporção de 5:3 garantiu uma maior homogeneidade nos poros, logo, uma espuma uniforme e flexível. Assim, esta conduziu à formação de polímero com melhores características e, portanto, esta foi a proporção empregada na avaliação do processo de imobilização da CalB.

Figura 9 - Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros polioli e isocianato, respectivamente, sendo (a) 5 e 3 mL e (b) 6 e 2 mL.



A enzima CalB liofilizada foi imobilizada em espuma de poliuretano utilizando diferentes metodologias, com o objetivo de estudar a interação do biocatalisador com o suporte e escolher o método mais promissor para posterior aplicação. A Tabela 2 apresenta a atividade enzimática (AE) para a enzima livre e para os derivados imobilizados. Pode-se notar que a enzima imobilizada por incorporação ao suporte (PU) se destacou das demais em termos de atividade hidrolítica (5,52 U/g), possivelmente porque toda a enzima a ser imobilizada ficou aderida ao suporte, não havendo perdas. Já os demais métodos apresentaram 49, 56 e 70 % de imobilização, para PU-ADS, PU-PEI e PU-PEI-GA, respectivamente. O método que apresentou recobrimento com PEI e ativação com GA apresentou o maior valor (3,28 U/g), porém não diferiu significativamente do PU-ADS (2,30 U/g) e PU-PEI (3,09 U/g).

Tabela 2 – Efeito do método de imobilização na atividade enzimática (AE) em comparação com a enzima CalB livre.

<b>Métodos de imobilização</b>	<b>AE (U/g)*</b>
Enzima livre	4,68 ± 0,13 <sup>a</sup>
PU	5,52 ± 0,65 <sup>a</sup>
PU-ADS	2,30 ± 0,27 <sup>b</sup>
PU-PEI	3,09 ± 0,72 <sup>b</sup>
PU-PEI-GA	3,28 ± 0,68 <sup>b</sup>

\*Média ± desvio padrão (n=3) p< 0,05.

Um dos objetivos do estudo com a utilização de polietilenoimina (PEI) nos suportes é garantir uma maior força mecânica, além de dar uma característica hidrofílica aos derivados imobilizados (BAHULEKAR et al., 1991; MATEO et al., 2007). Glutaraldeído (GA) também é empregado no sentido de melhorar a imobilização, como agente de ligação (KAWAGUTI e SATO, 2008). Dentre os métodos apresentados, com exceção do método onde se adicionou a enzima durante a formação da espuma (PU), o método utilizando a espuma com recobrimento de PEI e GA apresentou o melhor resultado, o que já era esperado, considerando o que foi explanado anteriormente.

Mesmo considerando as vantagens da utilização de PEI e GA, no presente trabalho estes não foram os que apresentaram os maiores valores de atividade enzimática, possivelmente por perdas associadas ao processo de imobilização, já que a enzima foi imobilizada após a

formação do suporte. No caso do PEI, também pode-se considerar a massa molar. Segundo estudo realizado por Cui et al. (2013) a massa molar do polímero influencia diretamente na atividade do imobilizado. Ainda de acordo com este estudo, no qual a lipase de *Yarrowia lipolytica* foi imobilizada em espuma de poliuretano, a massa molar do PEI que possibilitou a maior atividade enzimática foi 70000 Da, enquanto que o utilizado no presente trabalho foi de 25000 Da. Possivelmente, PEI com maior massa molar pode fornecer mais sítios de ligação amino-grupo, influenciando na atividade da enzima (CUI et al., 2013).

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS IMOBILIZADOS EM ESPUMA DE POLIURETANO

### 4.2.1 Densidade aparente

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, tornando uma medida interessante para ser avaliada. Assim, o controle da densidade das espumas de poliuretano é feito, principalmente, através das quantidades empregadas de água e agentes de expansão auxiliares, como o cloreto de metileno, acetona e CO<sub>2</sub>.

Os valores calculados para densidade aparente dos derivados enzimáticos imobilizados são apresentados na Tabela 3, e mostram valores distintos entre si. Os preparados enzimáticos, PU e PU-ADS, não apresentaram diferença significativa entre si, com 0,627 e 0,853 g/cm<sup>3</sup>, respectivamente. Já o PU-PEI (1,040 g/cm<sup>3</sup>) e PU-PEI-GA (1,613 g/cm<sup>3</sup>), diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si e dos demais métodos de imobilização. Estes dois derivados que receberam acréscimo de polietilenoimina (PEI) e de glutaraldeído (GA) apresentaram valores superiores de densidade aparente. Uma vez que esta medida considera o processo da reação de expansão da espuma e sua massa, pode-se admitir que o processo de expansão da espuma se deu de maneira uniforme em todos os derivados obtidos, e a diferença entre eles foi causada pelos agentes adicionados.

Tabela 3 - Densidade aparente dos derivados imobilizados.

<b>Métodos de imobilização</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)*</b>
PU	0,627 ± 0,140 <sup>a</sup>
PU-ADS	0,853 ± 0,115 <sup>a</sup>
PU-PEI	1,040 ± 0,208 <sup>b</sup>
PU-PEI-GA	1,613 ± 0,786 <sup>c</sup>

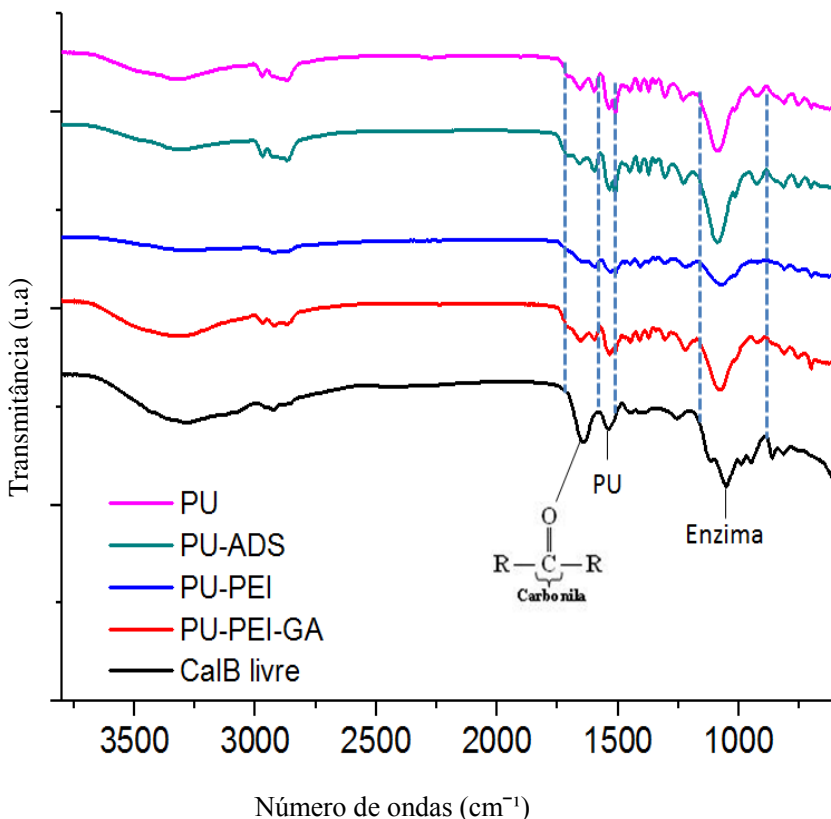
\*Média ± desvio padrão (n=3) p< 0,05.

#### **4.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EITF)**

A espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (EITF) foi realizada nos derivados imobilizados com objetivo de avaliar o polímero formado durante a reação de polimerização, podendo observar se todos os reagentes inseridos no meio reacional foram transformados em produtos da reação.

Pelos espectros, conforme Figura 10, pode-se observar a formação de uretano na região de 1600 cm<sup>-1</sup> e 1500 cm<sup>-1</sup>, característica do anel aromático do toluenodiisocianato (ZANETTI-RAMOS et al., 2006). Durante a formação do poliuretano, desaparecem os grupos OH e diisocianato e aparecem grupos NH e carbonila, o que indica a reação entre os grupos OH e o isocianato do tolueno diisocianato. A região em 1705 cm<sup>-1</sup> é característica de ligações carbonila, e a faixa que compreende 2924 cm<sup>-1</sup> a 2852 cm<sup>-1</sup> é característica da presença de C-H (STUARD, 2004).

Figura 10 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (EITF) de *Candida antarctica* lipase B imobilizada em espuma de poliuretano por diferentes metodologias: por incorporação ao suporte (PU), por adsorção ao suporte (PU-ADS), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA) e enzima livre CalB.



Assim, com o objetivo de verificar a imobilização da enzima, o espectro de EITF da enzima livre foi comparado com o espectro das enzimas imobilizadas. A enzima livre apresentou espectro típico, com bandas de absorção associadas com grupo amina (CONH), grupos amina, primário e secundário, entre  $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  (BARTH et al, 2007). 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.

Ao avaliar o derivado enzimático imobilizado por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), conclui-se que há possibilidade do PEI ter impedido que o grupo funcional da enzima ficasse exposto, por isso, o pico da enzima ( $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ ) não foi tão relevante quanto os outros preparados enzimáticos. Além disso, os métodos por incorporação ao suporte (PU) e por adsorção ao suporte (PU-ADS) destacam-se por apresentar os maiores picos do uretano ( $1600\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$ ) e da enzima livre ( $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ ), garantindo a imobilização.

### **4.2.3 Morfologia dos derivados imobilizados de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano**

O suporte foi preparado pela mistura do polioli e diisocianato. A microscopia da espuma gerada, utilizada como suporte na imobilização de CalB, está apresentada na Figura 11. Cabe salientar que os espaços vazios são resultantes das expansão provocada pela liberação do  $\text{CO}_2$ .

Nas Figuras 12, 13, 14 e 15 são apresentadas as microscopias das enzimas imobilizadas em espuma de poliuretano por incorporação ao suporte (PU), imobilizada por adsorção ao suporte (PU-ADS), por troca iônica utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA), respectivamente. Pode-se observar, de maneira geral, que a morfologia dos suportes é alterada pelos diferentes métodos de imobilização utilizados, confirmando a imobilização proposta. O suporte considerado como mais homogêneo foi o que apresentou revestimento com PEI (Figura 14). A Figura 15 mostra a diferença no suporte com o acréscimo da solução de GA.

Figura 11 - Fotomicroscopia da espuma de poliuretano utilizada como suporte para a imobilização de CalB.

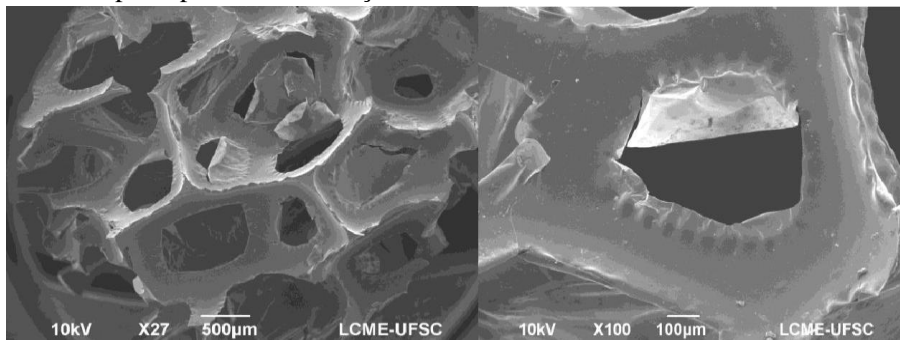


Figura 12 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano por incorporação ao suporte (PU).

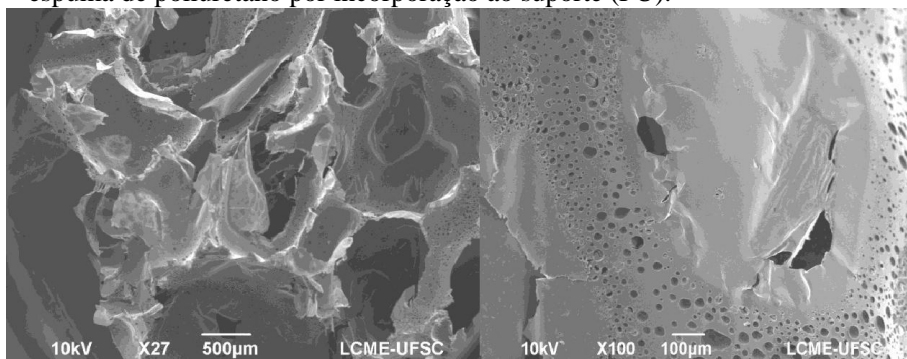


Figura 13 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano imobilizada por adsorção ao suporte (PU-ADS).

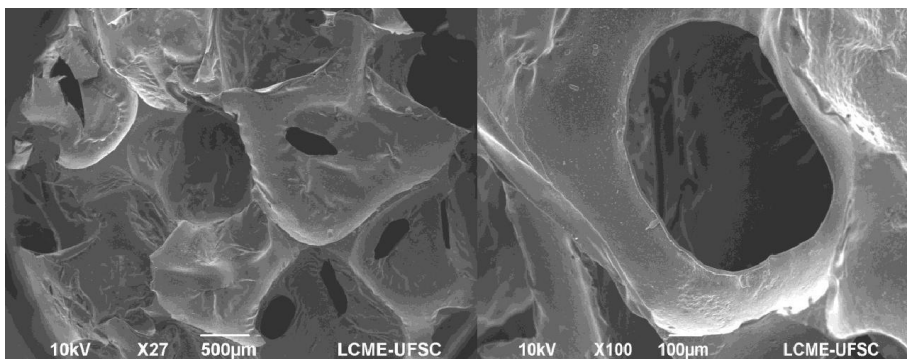


Figura 14 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI).

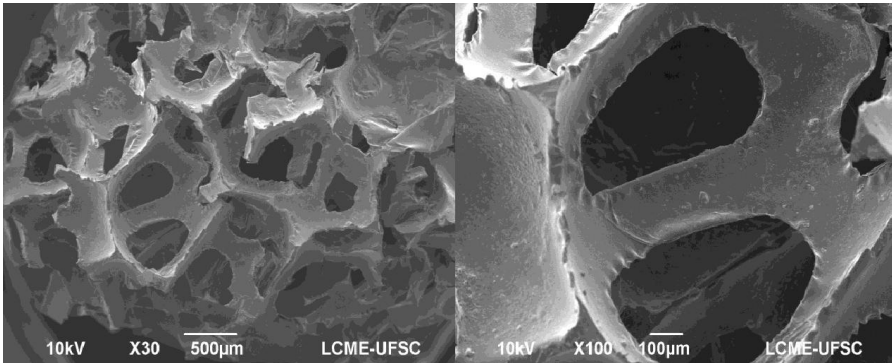
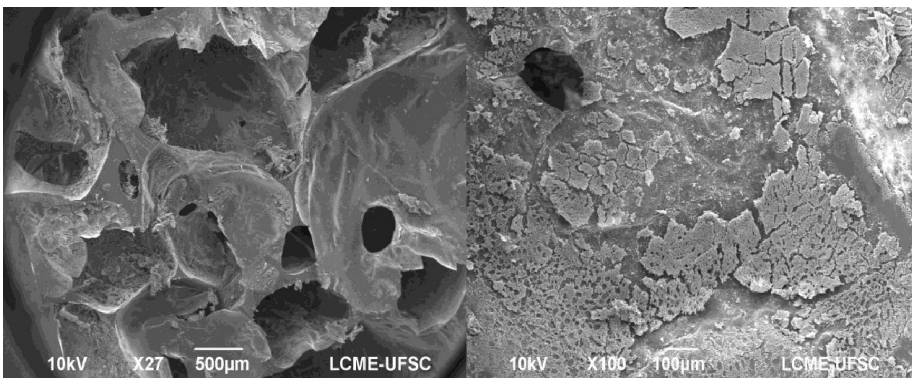


Figura 15 - Fotomicroscopia da enzima CalB imobilizada em espuma de poliuretano por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA).

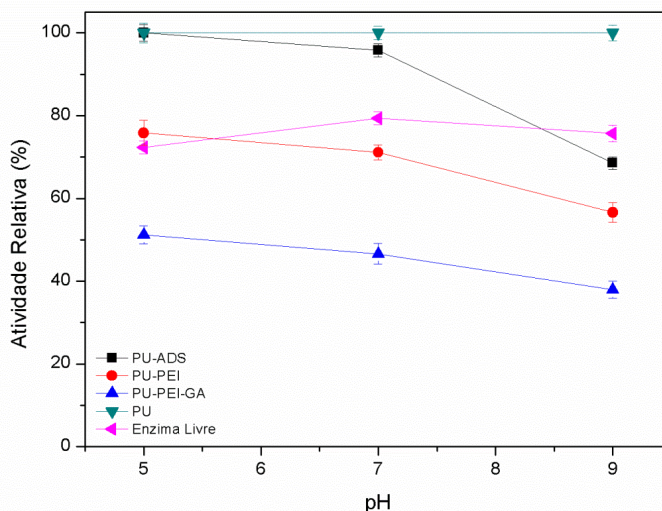




#### 4.2.4 Estabilidade da lipase CalB imobilizada em EPU em diferentes pHs

Considerando que a aplicação industrial de uma enzima também vai depender da faixa de pH em que ela mantém sua atividade, foi avaliado o efeito de diferentes pHs (5,0; 7,0 e 9,0) sobre a atividade da enzima livre e dos diferentes derivados imobilizados, em 24 h de incubação. Os derivados PU-ADS, PU-PEI e PU-PEI-GA (Figura 16) apresentaram maior estabilidade em pH 5,0 com atividade relativa de 100, 75,85 e 51,15%, respectivamente. Já para a enzima livre, o melhor pH foi de 7,0 com 79,36% de atividade relativa. O derivado imobilizado PU manteve-se estável em toda faixa de pH avaliada (5,0; 7,0 e 9,0), mostrou-se com 100% de atividade relativa. Desta forma, pode-se inferir que esse método mantém a estrutura da enzima, impedindo que sofra as variações ocasionais por diferentes forças iônicas do meio.

Figura 16 - Efeito do pH sob a atividade hidrolítica de CalB livre e dos derivados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano por 24 h de incubação.



Estudos como o de Cadena et al. (2010), que avaliaram o desempenho catalítico da enzima invertase covalentemente imobilizada

em espuma de poliuretano, encontraram valores de pH ótimos de 4,5 para enzima livre e 5,0 para a enzima imobilizada, apresentando 93 e 93,5% de atividade relativa. Já Cui et al. (2013) relataram, ao imobilizar a lipase de *Yarrowia lipolytica* em espuma de poliuretano (EPU), resultados diferentes dos obtidos no presente trabalho. Os autores estudaram o efeito do pH sobre a enzima imobilizada em EPU e em EPU revestida com PEI. Valores de 100% de atividade residual foram obtidos para os dois métodos em pH 8,0, para as enzimas imobilizadas e enzima livre, os valores foram inferiores a 50%, chegando a próximo de zero em pH 6,0 e 9,0.

#### **4.2.5 Parâmetros cinéticos da lipase CalB livre e dos derivados imobilizados em EPU**

As constantes cinéticas foram determinadas utilizando como substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). As atividades da lipase livre e imobilizada foram avaliadas em diferentes concentrações de substrato (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM). Os resultados foram plotados em gráficos de Lineweaver & Burk. Logo,  $V_{\text{máx}}$  indica a máxima velocidade possível para a transformação correspondente, enquanto o  $K_m$  indica a afinidade da enzima ao substrato. A análise cinética demonstra que a dependência da atividade lipolítica de lipases livre e imobilizada pode ser descrito por modelo de Michaelis-Menten.

Conforme pode ser observado na Tabela 4, os valores aparentes de  $K_m$  dos derivados enzimáticos imobilizados (PU-ADS e PU) e a enzima livre foram semelhantes entre si, 0,04, 0,07 e 0,06 mM, respectivamente. Assim, demonstra a eficiência do processo de imobilização proposto, mostrando que a enzima imobilizada em EPU se mantém acessível ao substrato. Os derivados obtidos pelos métodos PU-PEI (0,15 mM) e PU-PEI-GA (0,11 mM) mostraram-se equivalentes, porém, maiores que a enzima livre (0,06 mM). Os valores de  $V_{\text{máx}}$  para os preparados enzimáticos PU-ADS (220  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), PU-PEI (260  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) e PU-PEI-GA (280  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), foram similares, porém, maiores que o PU (160  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), todos inferiores ao valor obtido para a enzima livre (490  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ).

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos da lipase livre CalB e dos derivados imobilizados em EPU.

Métodos de imobilização	$V_{\text{máx}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	$K_m$ (mM)
Enzima livre	490	0,06
PU	160	0,07
PU-ADS	220	0,04
PU-PEI	260	0,15

Kirtikumar et al. (2014) avaliaram a imobilização de lipase de *Candida cylindracea* em uma mistura ternária de polímero via metodologia de aprisionamento e encontraram valores de  $V_{\text{máx}}$  para o extrato bruto e enzima imobilizada de 320 e 345  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , respectivamente. Ao avaliar o  $K_m$  para o extrato bruto e enzima imobilizada, os autores encontraram valores de 10,57 e 16,59 mM, respectivamente. Assim, o maior valor de  $K_m$  revelou que a enzima imobilizada tem a menor afinidade para o substrato do que o extrato bruto, o que pode ser devido à perda da flexibilidade da enzima durante o processo de imobilização.

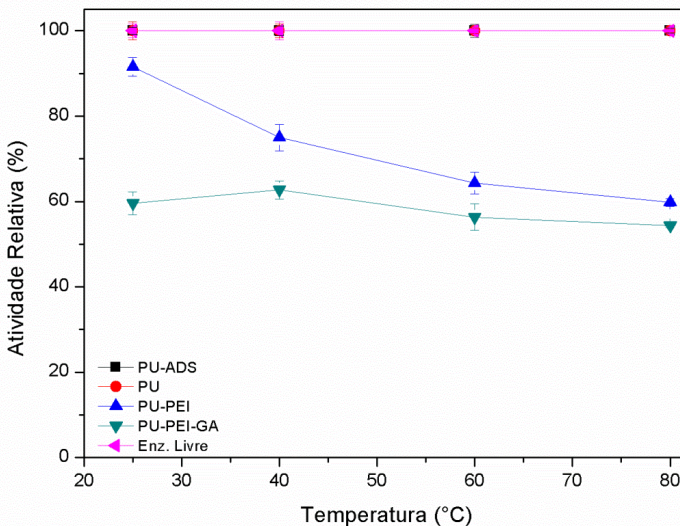
#### 4.2.6 Estabilidade térmica da enzima livre CalB e dos derivados imobilizados em EPU em diferentes temperaturas

A avaliação da estabilidade da enzima livre e dos derivados enzimáticos imobilizados em função do tempo de exposição a diferentes temperaturas (25, 40, 60 e 80 °C) foi realizada por 48 horas, e os métodos considerados como melhores em relação à estabilidade a temperatura, pH e parâmetros cinéticos (PU e PU-ADS) foram avaliados durante 60 dias de incubação, conforme mostram as Figuras 17 e 18.

Após 48 horas de incubação (Figura 17) observou-se que a atividade dos derivados enzimáticos (PU e PU-ADS) e a enzima livre submetidas nas temperaturas estudadas não apresentaram queda, mantendo uma atividade residual de 100% (valor calculado em relação às respectivas atividades iniciais). Entretanto, pode-se notar que o PU-PEI a temperatura de 80 °C apresentou uma queda em sua atividade, obtendo 59,8% de atividade residual. O derivado enzimático PU-PEI-GA manteve 60% de atividade residual. Este fato mostra que a interação

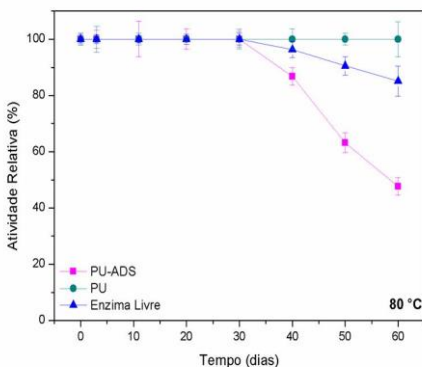
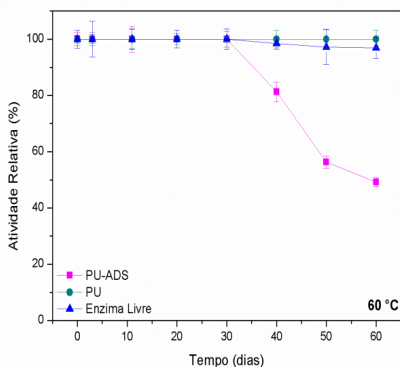
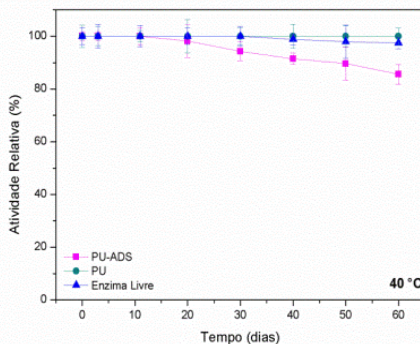
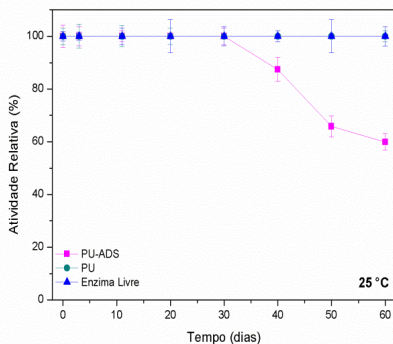
entre o suporte, PEI e GA não foi efetiva para que estes tivessem uma atuação favorável na imobilização, ou estes podem ter impedido os sítios ativos da enzima de interagirem com o substrato.

Figura 17 - Estabilidade em diferentes temperaturas de CalB imobilizada em EPU por diferentes metodologias: por incorporação ao suporte (PU), por adsorção ao suporte (PU-ADS), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA), e enzima livre CalB, por 48 h.



Cabe mencionar que é muito interessante para aplicação industrial que os biocatalisadores resistam a uma ampla faixa de temperatura, uma vez que poderão ser utilizados em diversas condições reacionais. Em termos de aplicação, também é atraente que o derivado imobilizado resista por um longo período de tempo nas temperaturas determinadas. A Figura 18 mostra a atividade relativa dos imobilizados que mais resistiram nas temperaturas estudadas, PU e PU-ADS, ao longo de 60 dias de incubação. Além disso, estes dois preparados enzimáticos, destacaram-se dos demais, apresentando melhores valores de pHs e parâmetros cinéticos.

Figura 18 - Estabilidade térmica, CalB immobilizada por incorporação ao suporte (PU), por adsorção ao suporte (PU-ADS) e enzima livre CalB durante 60 dias de incubação.



O acompanhamento da estabilidade à temperatura foi monitorado a cada 10 dias de incubação. Após 40 dias de exposição a 25, 40, 60 e 80 °C, a atividade residual do derivado PU-ADS teve uma queda, mostrando atividade residual de 87,4; 91,5; 81,2 e 86,8%, respectivamente em relação às atividades iniciais. No final dos 60 dias de incubação, o método de imobilização da CalB por incorporação ao suporte (PU) manteve-se estável, com 100% de atividade relativa. O derivado enzimático imobilizado por adsorção ao suporte (PU-ADS)

mostrou uma diminuição em relação a sua atividade relativa inicial de 59,91; 85,57; 49,16 e 47,7% nas diferentes temperaturas estudadas (25, 40, 60 e 80 °C). A enzima livre CalB demonstrou decréscimo na sua atividade residual (97,4; 96,95 e 85,07%) a 40, 60 e 80 °C. Cui et al. (2013) explicam que a temperatura ótima para a lipase livre e as lipases imobilizadas por aprisionamento na espuma de poliuretano (PU) foi de 40°C.

De acordo com Silva et al. (2012), a estabilidade da lipase CalB solúvel livre e imobilizada em diferentes preparações de quitosana foi avaliada na temperatura de 60 °C por 21 horas, onde verificou-se que a enzima livre reduziu 100% de sua atividade e a CalB imobilizada manteve em torno de 40% de sua atividade. Cadena et al. (2010) imobilizaram a invertase em espuma de poliuretano e verificaram que a enzima depois de 60 dias de incubação a temperatura de 70 °C manteve 68,5% de atividade residual. Silva et al. (2013), ao estudarem a estabilidade da atividade de inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em espuma de poliuretano, encontraram 49,7% de atividade residual após 59 dias de incubação a 70 °C.

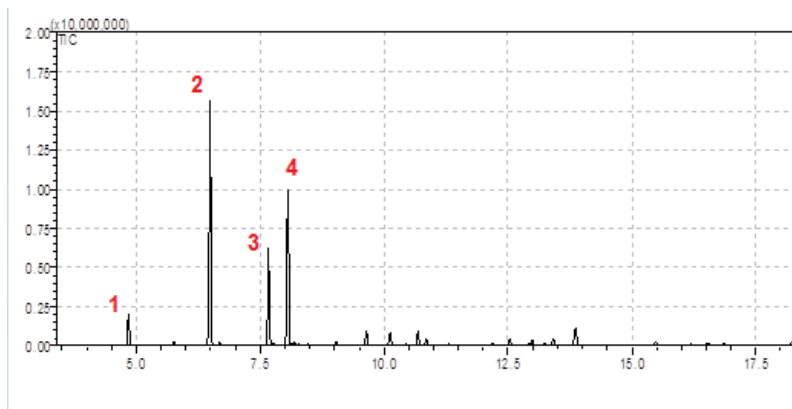
Considerando a facilidade do desenvolvimento da metodologia na produção das enzimas imobilizadas em PU e PU-ADS, as constantes cinéticas e a estabilidade referente à ampla faixa de temperatura por vários dias de incubação, estes preparados enzimáticos foram selecionados para posterior aplicação na síntese do geranyl propionato.

## **4.2.7 Produção enzimática de éster a partir do óleo essencial de citronela**

### **4.2.7.1 Composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*)**

A Figura 19 apresenta o perfil cromatográfico do óleo essencial de citronela, obtido por CG-MS. Através deste pode-se comprovar o laudo do fornecedor (Tabela 5), ou seja, identificando os compostos presentes no óleo de citronela: D-limoneno (pico 1), citronelol (pico 2), linalol (pico 3) e geraniol (pico 4).

Figura 19 - Cromatograma do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*).



Na Tabela 5 pode-se observar a composição química do óleo essencial de citronela utilizado no trabalho, cujas especificações, fornecidas por laudo do fornecedor, apresentam citronelol (49,49%) como componente majoritário, seguido do geraniol (31,99%), linalol (15,87%) e D-limoneno (2,65%). As concentrações dos compostos (citronelol e geraniol) foram superiores às reportadas por Baranauskiene et al. (2006), que encontraram 8,7% de citronelol e 16,4% de geraniol. Segundo Marco et al. (2007) variações que ocorrem na composição química dos óleos essenciais extraídos das plantas da mesma espécie são comuns e dependem da época e lugar da coleta, espaçamento entre as plantas, altura em que são cortadas e pH do solo, entre outros.

Como as reações de esterificação são favoráveis aos álcoois primários (CASTRO et al., 1997), a concentração de geraniol, agente limitante, foi monitorada durante o ensaio na síntese enzimática do éster geranil propionato.

Tabela 5 - Composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*).

<b>Características</b>	<b>Especificações</b>
Aparência	Líquido límpido
Cor	Incolor e levemente amarelado
Densidade (20°C) (g/cm <sup>3</sup> )	0,885
Índice de Refração (20 °C)	1,473
Citronelol (%)	49,49
Geraniol (%)	31,99
Linalol (%)	15,87
D- limoneno (%)	2,65

Fonte: Farmácia Extrato Vital, (Segundo laudo 21953 da PharmaSpecial).

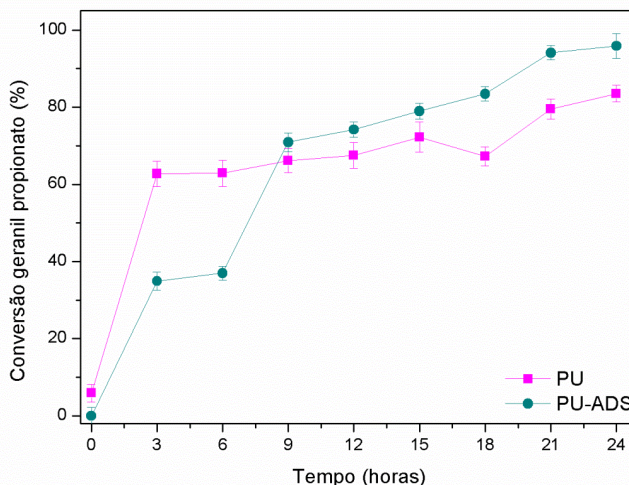
#### 4.2.7.2 Síntese enzimática de geranil propionato

Geranil propionato foi produzido enzimaticamente, de acordo com os resultados obtidos em experimentos de Paroul et al. (2012), com óleo de citronela e ácido propiônico na razão de 5:1 (m/m), utilizando 5% (m/v) de enzima, temperatura de 60 °C, 150 rpm. A reação apresentou elevadas conversões em geranil propionato (Figura 20), com conversão máxima em 24 h, (83,5% para o derivado imobilizado PU e 95,9% para o PU-ADS). Ao avaliar o comportamento da enzima livre CalB na produção deste éster em 24 horas de reação obteve-se 99% de conversão.

Considerando a elevada conversão e o baixo custo do óleo de citronela, pode-se afirmar que a substituição de álcoois comerciais pelos óleos essenciais, pode tornar o processo economicamente viável. Cabe ressaltar que em 6 horas de reação com 5% (m/v) de concentração do derivado enzimático obtido pelo método PU obteve-se 62,9% de conversão em éster, e em 9 horas de reação a conversão do geranil propionato para o imobilizado PU-ADS foi de 70,9%.



Figura 20 - Conversão em geranil propionato utilizando os derivados enzimáticos imobilizados obtidos por incorporação ao suporte (PU) e por adsorção ao suporte (PU-ADS).



Diante dos estudos realizados por Paroul et al. (2010), com o objetivo principal a otimização da produção do geranil propionato num sistema isento de solvente, utilizando 10% da lipase imobilizada comercialmente como catalisador (Novozym 435), em uma temperatura de 40 °C, e proporção molar de geraniol e ácido propiônico de 3:1, 150 rpm, obtiveram uma conversão de cerca de 93%. Enquanto que a 60 °C em 6 horas de reação, nas mesmas condições de razão molar e agitação, obtiveram 85,8% de conversão em geranil propionato.

Kumar et al. (2004) investigaram a síntese de etil palmitato, utilizando a lipase imobilizada comercial Novozym 435 como catalisador (2% em peso de enzima), proporção molar álcool/ácido de 12:1 na temperatura de 55 °C e 150rpm em 12 h de reação e obtiveram cerca de 97% de conversão. Já Güvenç et al. (2002) avaliaram a produção enzimática de isoamil acetato, utilizando Novozym 435 como catalisador (5% em peso de enzima) e proporção molar ácido/álcool de 1:2 na temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm em 6 h de reação e obtiveram conversão de 80%. Ainda, de acordo com a pesquisa de Ikeda & Kurokawa (2001), que usaram lipase de *Candida antarctica*

imobilizada em fibra de gel de acetato de celulose -  $\text{TiO}_2$  para conduzir a síntese de geranil acetato, após 100 horas de reação, o rendimento da reação foi de 85%. A conversão em ésteres varia significativamente com relação ao composto formado, enzima utilizada, e método de imobilização empregado, podendo variar de poucas horas até dias de reação. Além disso, a escolha do biocatalisador ideal para uma dada reação também vai depender do número de vezes que este poderá ser reutilizado, sendo esta uma das principais vantagens de se imobilizar uma enzima.

#### **4.2.8 Estudo de sucessivos ciclos de uso dos derivados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano (EPU) na síntese de geranil propionato**

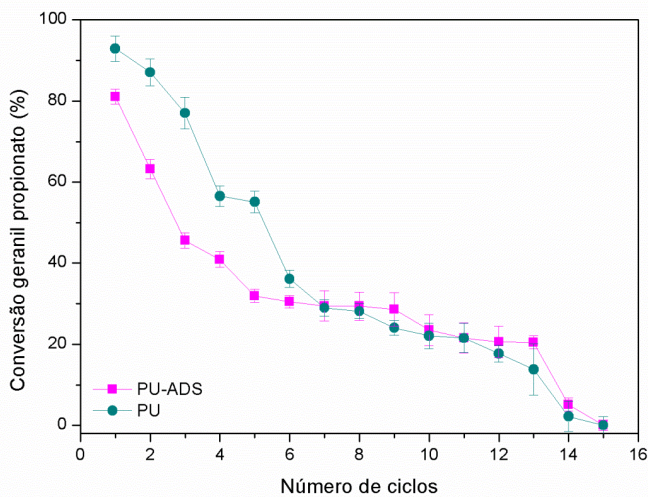
A estabilidade operacional do sistema de enzimas imobilizadas é muito importante para as aplicações industriais. Neste estudo, a capacidade de reutilização da lipase de *Candida antarctica* fração B imobilizada em EPU por aprisionamento (PU) e por adsorção (PU-ADS) foi avaliada por sucessivos ciclos na síntese do éster geranil propionato.

A reação para ambos os métodos de imobilização foi realizada com um tempo de 24 horas, a 60 °C, 150 rpm e 5 % (m/v) de concentração de enzima. O processo foi repetido em 15 ciclos consecutivos. Como podem ser observados na Figura 21, os derivados enzimáticos PU e PU-ADS, inicialmente conduziram a um elevado rendimento em éster, 92,9 % e 81,1 %, respectivamente. Durante os 15 ciclos de reutilização foi observada uma redução contínua no rendimento, até que o biocatalisador imobilizado reduzisse a atividade, relacionada à esterificação para produção de geranil propionato. Este fato provavelmente se deve à inativação das lipases e ao acúmulo de água no suporte de imobilização (ARROYO et al., 1999).

Os resultados indicam uma melhor estabilidade operacional dos preparados enzimáticos imobilizados em espuma de poliuretano (PU e PU-ADS), quando comparada com a enzima imobilizada comercialmente (Novozym 435), analisada por Paroul et al. (2010), onde pôde-se observar que após 10 ciclos consecutivos a síntese do geranil propionato caiu drasticamente, sendo verificada conversão não significativa em geranil propionato. Outros estudos, como reportado por Magnan et al. (2004), ao avaliar a estabilidade operacional da CalB imobilizada em uma membrana cerâmica para síntese de butil acetato e por Rodrigues et al. (2008), ao avaliar a estabilidade da mesma enzima

por adsorção em carvão ativado para síntese de butil butirato, demonstraram perda completa da atividade enzimática após 4 e 6 ciclos de uso, respectivamente.

Figura 21 - Reutilização da enzima CalB imobilizada por incorporação ao suporte (PU) e por adsorção ao suporte (PU-ADS) na síntese do geranyl propionato.



## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 CONCLUSÕES

A lipase B de *Candida antarctica* (CalB) foi imobilizada em espuma de poliuretano por diferentes métodos de interação enzima-suporte: por adsorção ao suporte (PU-ADS), por incorporação ao suporte (PU), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina (PU-PEI), por ligação covalente utilizando revestimento por polietilenoimina e tratamento com glutaraldeído (PU-PEI-GA).

O processo de imobilização que possibilitou a maior atividade enzimática foi o PU (5,52 U/g) seguido do PU-PEI-GA (3,28 U/g), sendo que este mesmo derivado enzimático (PU-PEI-GA) apresentou a maior densidade (1,63 g/cm<sup>3</sup>). Ao avaliar os parâmetros cinéticos dos preparados enzimáticos o PU (0,07 mM) e o PU-ADS (0,04mM), mostraram-se maior afinidade da enzima pelo substrato, e  $V_{\text{máx}}$  de 160 e 220  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ , respectivamente. Através das fotomicroscopias analisadas pelo MEV e o EITF, foi confirmada a imobilização da enzima nas diferentes metodologias desenvolvidas.

O derivado enzimático PU manteve 100% de atividade residual nos pHs avaliados (5,0; 7,0 e 9,0). Para o PU-ADS, o melhor valor de pH foi de 5,0 e 7,0 mantendo 100 e 95,8 % de atividade residual, respectivamente. Ao avaliar a estabilidade em diferentes temperaturas (25, 40, 60 e 80 °C), o método tratado como PU-ADS, apresentou uma queda em 80 °C, com atividade relativa inferior a 50%. Já o PU manteve-se estável em 100% de atividade residual em toda faixa de temperatura analisada no final dos 60 dias de incubação.

Considerando a simplicidade da metodologia do PU e PU-ADS e suas estabilidades frente aos pHs, parâmetros cinéticos e temperaturas estudadas, estes foram utilizados para a aplicação na síntese do geranil propionato, onde obteve-se conversões de 83,5% para PU e 95,9% para PU-ADS, em 24 h de reação, utilizando óleo de citronela e ácido propiônico como substratos. Estes mesmos derivados demonstraram estabilidade operacional após vários ciclos de uso.

Portanto, é possível concluir que os diferentes métodos de imobilização utilizando suporte de espuma de poliuretano foram capazes

de fornecer protocolos simples e eficientes para a estabilização e a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CalB). Assim, evidencia-se que a estabilidade nas temperaturas estudadas e alta atividade se torna um fator de particular interesse para aplicação em processos industriais, podendo-se considerar uma alternativa viável na aplicação como catalisador em reações de esterificação.

## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Estudar a estabilidade do éster geranil propionato;
- Avaliar a possibilidade encapsulamento do éster geranil propionato;
  - Realizar estudo de viabilidade econômica a respeito da produção de bioaromas a partir do óleo essencial de citronela;
  - Estudo das condições de produção do sistema selecionado em termos de concentração da enzima (% m/m em relação aos substratos) e da razão molar dos substratos envolvidos na reação de aplicação;
  - Variação da razão molar, tempo de reação, temperatura e concentração de enzima visando otimizar a produção de éster;
  - Produção de geranil propionato em reatores empacotados, em modo contínuo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. H.; REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 55-62, 2010.

ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a Indústria. **Química Nova**, v. 28, p. 64-75, 2005.

ARROYO, M.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J.V. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 3-12, 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.

BADGUJAR, C. K.; DHAKE, P. K.; BHANAGE, M. B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1335–1347, 2013.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P. R.; DEWETTINCK, K.; VERHÉ, R. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. **Food Research International**, v. 39, p. 413–425, 2006.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 124–132, 2011.

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

BATISTELLA, L. **Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) -Programa de Pós-graduação em Engenharia de alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, Erechim.

BATISTELLA, L.; USTRA, M. K.; RICHETTI, A.; PERGHER, S. B.C.; TREICHEL, H.; J. V. OLIVEIRA, J. V. ; LERIN, L. ; DE OLIVEIRA, D.. Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 351–358, 2012.

BAHULEKAR, R.; AYYANGAR N.R., PONRATHNAM, S. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, n.11, p. 858-68, 1991.

BON, E. P. S.; PEREIRA, J.R., N.; ANTUNES, A. M. S.; MAIOR, A. M. S.; ABARZÚA, E. G. O.; PINTO, G. F.; SILVA JR., J. G.; ANTUNES, O. A. C. **Tecnologia Enzimática**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIRJAN / SENAI, v. 1. p.113, 1999.

BRÍGIDA A.I.S., **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra da casca de coco verde como suporte**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BUKHARI, A.; IDRIS, I.; ATTA, M.; LOONG, T. C. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. **Chinese Journal of Catalysis**, v.35, p. 1555–1564, 2014.

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

CALLISTER, W.D. Jr. **MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING An Introduction**. - John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-72, 2006.

CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. A. F. Síntese de ésteres terpenoides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, p. 197-205, 1997.

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

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.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L.; JÚNIOR, C. V.; DETOFOL, M. R.; LERIN, L. A.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 742-751, 2012.

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.; SILVA, M. J. A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M. M. C., OLIVEIRA, J. V.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. de. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.99, p.56- 67, 2014.

CONCERTI, A.; DEL BORGHI, A.; GANDOLFI, R.; MOLINARI, F.; PALAZZI, E; PEREGO, E.; PEREGO, E.; ZILLI, M. Simplified kinetics and thermodynamics of geraniol acetylation by lipophilized cells of *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 216-223, 2002.

CORREIA, A. C. V. B.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, M. S. L. Produção de emulsionantes através da glicerólise de óleo de bagaço de azeitona catalisada pela lipase da *Candida Rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 7-15, 2011.



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

CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; SILVA, A. A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMASD, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTEE, R.; PINTOB, J. C.; FREIRE, D. M. G.. Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica* effect of the support nature on catalytic properties. A.G. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59– 67, 2014.

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

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support. **Food Technology**, v. 3, p. 1–9, 2013.

DE CARLI I.C. **Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) - Centro de Ciências Naturais. Universidade Regional de Blumenau – FURB, Blumenau.

DONG, L.; GE, C.; QIN, P.; CHEN, Y.; XU, L. Q. Immobilization and catalytic properties of candida lipolytic lipase on surface of organic intercalated and modified MgAl-LDHs. **Solid State Sciences**, v. 31, p. 8-15, 2014.

DZIEZAK J.D. Enzymes: catalyses for food processes. **Food Technology**, v.45, p. 78-85, 1991.

FERNANDES, I.A. **Estudo da imobilização de lipases utilizando poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) e poliuretano (PU) como suportes**. Erechim, URI, 2013. 132 p. Tese. (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, Erechim.

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

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator leito fixo**. 2010. 136 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Uberlândia.

FRAMPTON, M. B.; ZELISKO, P. M. Chain length selectivity during the polycondensation of siloxane-containing esters and alcohols by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Enzyme and Microbial Technology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec>, 2014.

FREITAS, L. **Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**. 2006. (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C., CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

FORDE, J.; VAKUROV, A.; GIBSON, T.D.; MILLNER, P.; WHELEHAN, M.; MARISON, I.W.; O'FAGÁIN, C. Chemical modification and immobilization of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p. 203–209, 2010.

GAO, S.; WANG, Y.; WANG, T.; LUO, G.; DAI, Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 996–999, 2009.

GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. **Chirality Program**, v.17, p.1-15, 2005.

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 923-930, 2011.

GUTARRA, M.L.E.; CAVALCANTI, E.D.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. 2005. Lipase Production by solid-state fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 121-124, p. 105-116, 2005.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 379-386, 2002.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of Milk/whey Lactose by  $\beta$ -galactosidase: A Comparative Study of Stirred Batch Process and Packed Bed Reactor Prepared with Calcium Alginate Entrapped Enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, p. 576–580, 2009.

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.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v.30, p.550–563, 2012.

IKEDA, Y.; KUROKAWA, Y. Synthesis of geranyl acetate by lipase Entrap – immobilized in cellulose acetate-TiO<sub>2</sub> gel fiber. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, p. 1099-1103, 2001.

IRIMESCU, R.; SAITO, T.; KATO, K. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 69-73, 2004.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.396-403, 1998.

JUN,C.; JEON,B. W.; JOO, J. C.; LE, Q. A. T.; GU, S.; BYUNA,S.; CHOA, D. H.; KIMB, D.; SANGC, B.; KIMA, Y. H. Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1181–1187, 2013.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P.

Production of biodiesel using immobilized lipase--a critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 253-64, 2008.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1-15, 2012.

KAWAGUTI, H.Y.; SATO, H.H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v.31, n.1, p.134-143, 2008.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.

KIRTIKUMAR C. BADGUJAR, KISHOR P. DHAKE, BHALCHANDRA M. BHANAGE. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for *N-acylation* reactions. **Process Biochemistry**, v.48, p. 1335–1347, 2014.

KOBLITZ, M.G.B. Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

KOVALENKO, G.A.; BEKLEMISHEV, A.B.; PERMINOVA, L.V.; MAMAEV, 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.

KOSHLAND Jr. D.E.; **Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis**. Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton New York, Symposium Proc. N. A. S. v. 44, p. 98-104, 1958.

KUMAR, R.; MADRAS, G.; MODAK, J. Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 43, p. 1568-1573, 2004.

KUPERKAR, V.V.; LADE V.G.; PRAKASH, A.; RATHOD, V.K. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: Optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.99, p. 143– 149, 2014.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial; Processos Fermentativos e Enzimáticos (Imobilização de enzimas (Michele Vitolo)**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, SP, v. 3, p. 391-394, 2001.

LERIN, L. A. **Produção enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais**. 2010. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Reviews**, v. 3, Intercept Ltd., 1985.

MAGNAN, E.; CATARINO, I.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; PREZIOSI-BELLOY, L.; BELLEVILLE, M. P. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. **Journal of Membrane Science**, v. 241, p. 161-166, 2004.

MAMURO, I. A.; CHENB, B.; EGUCHI, M. KUDO, T.; SUREKHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p. 53-58, 2001.

MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H; BORGES, N. S.S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 429-432, 2007.

MARTINS, V.G. Coprodução de lipase e biosurfactante em FES para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, 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, p. 1451-1463, 2007.

MATOS, L. M. C. **Hidrólise parcial do óleo de palma catalisada por lipases sob irradiação de micro-ondas. Síntese de diacilglicerol**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MATSUI, M. **Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano.** 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba.

McCABE, R.W.; TAYLOR, A. An investigation of the acyl-binding site of *Candida antarctica* lipase B. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.393–398, 2004.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

MENG, 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.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v.115, p.126–135, 2012.

MITCHELL, D.T.; LEE, S.B.; TROFIN, L.; LI, N.; NEVANEN, T.K.; SÖDERLUND, H.; MARTIN, C. Smart Nanotubes for Bioseparations and Biocatalysis. **Journal of the Americal Chemistry Society**, v.124, p.11864–11865, 2002.

NETTO, C.G.C.M.; TOMA, H.T.; ANDRADE, Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.85– 86, p.71– 92, 2013.

OZDEMIR, E. Biomimetic CO<sub>2</sub> Sequestration: 1. Immobilization of Carbonic Anhydrase within Polyurethane Foam. **Energy Fuels**, v.23, p.5725–5730, 2009.

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

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L.P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.; DE OLIVERA, D. Solvent-Free Production of Bioflavors by Enzymatic Esterification of Citronella

(*Cymbopogon winterianus*) Essential Oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.13–21, 2012.

PATEL R.N.; Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 804-826, 2002.

PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R.T. Lipase Biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v.4, p.971-982, 2011.

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

PIZARRO A.V.L., PARK E.Y.; Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1077-1082, 2003.

RASTIANA,Z.; KHODADADI, A. A.; VAHABZADEH, F.; BORTOLINID, C.; DONG, M.; MORTAZAVIA, Y.; MOGHAREI, A.; VESALI NASEHA, M.; GUO, Z. Facile surface functionalization of multi walled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 16–26, 2014.

RIGO E., NINOW J. L., POLLONI A. E., REMONATTO D., ARBTER F., VARDANEGA R., OLIVEIRA D., TREICHEL H., DI LUCCIO M. Improved lipase biosynthesis by a newly isolated *Penicillium* sp. grown on agricultural wastes. **Industrial Biotechnology**, v. 5, p. 1-5, 2009.

RODRIGUES, D. S.; CAVALCANTE,G. P.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase type b by adsorption on activated carbon. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, p. 125–133, 2008.

SANTIN, C.M.T.; SCHERER, R.P.; NYARI, N.L.D.; ROSA, C.D.; DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA, D. de; OLIVEIRA, J.V. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *Candida antarctica* B immobilized in polyurethane foam. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 87, p. 234-240, 2014.

SHARMA, R CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. v.19, p. 627-662, 2001.

SHELDON, R. A., PELT, S. V. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223 – 6235, 2013.

SHELKE, N.B.; NAGARALE, R.K.; KUMBAR, S.G. **Polyurethanes**. p. 123–144, Capítulo 7, Natural and Synthetic Biomedical Polymers, 2014.

SILVA, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo b imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina a**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012.

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. O.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. **Food and Bioproducts Processing**, v.91, p.54-59, 2013.

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E.M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 1846-1859, 2013.

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

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

VILAR, W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos**. 3ª Edição. Disponível em <http://www.poliuretanos.com.br>. 3ª Ed., Vilar Consultoria, Rio de Janeiro, Dez/2004.



WEETALL, H. H. Immobilized enzymes and their application in the food and beverage industry. **Process Biochemical**. p. 3-30, 1975.

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.

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