



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

KARINE PROCHNOW

**Uso do complexo enzimático imobilizado da
Manihot Dulcis em polímero alginato e óxido de
titânio.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do grau de bacharel em
Química.

Barreiras-BA

2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Karine Prochnow

***USO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO IMOBILIZADO DA
MANIHOT DULCIS EM POLÍMERO ALGINATO E ÓXIDO DE
TITÂNIO.***

A monografia foi _____ em reunião pública,
realizada no dia ____ de _____ de _____, no Instituto Ciências
Ambientais e Desenvolvimento Sustentável, da Universidade Federal da
Bahia, tendo como examinadores:

Prof. Dr. Luciana Lucas Machado, UFBA (Orientador)

Prof. Dr. Poty Rodrigues de Lucena, UFBA

Prof. Dr. Mauro Alves Bueno, UFBA

A DEUS
Por me dar força e coragem nos momentos difíceis e por permitir que eu chegasse até aqui. Aos meus pais, Edgar e Bronilda, demais familiares e amigos pelo apoio e torcida nesta etapa tão importante de minha vida.

AGRADECIMENTOS.

Agradeço aos meus pais, Edgar e Bronilda, por nunca terem deixado de acreditar em mim.

Aos meus irmãos e aos demais familiares, por me incentivarem a seguir em frente com este sonho.

A Vilmar Marcos Gromann, pela paciência todos estes anos e por acreditar que um dia tudo daria certo.

Ao professor Poty Rodrigues de Lucena pela orientação, oportunidade e paciência durante todos estes anos.

A professora Luciana Lucas Machado pela orientação e pela paciência durante o trabalho.

Aos meus amigos Laíssa Rodrigues Novais e Vinicius Caires Duarte, pelo companheirismo e pela amizade.

As colegas de faculdade Paula, Thamara e companheiros de laboratório, pelos dias de estudo e dedicação, que a cada dia presenteiam-me com suas agradáveis companhias e boas risadas.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste curso.

Agradeço a FAPESB e ao CNPQ pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

“ Da minha vida não quero muito... Quero apenas saber que tentei tudo o que quis, tive tudo o que pude, amei tudo o que valia e perdi apenas o que no fundo, nunca foi meu.”

(Carla de Paula)

“Se um dia tiver de escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se: Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor, com ele conquistará o mundo.”

(Albert Einstein)

Prochnow K. Pasta do professor: Uso de complexo enzimático imobilizado da *Manihot Dulcis* em polímeros e em óxido de titânio. 47 f. Trabalho de conclusão de curso – Bacharel. Instituto de ciências ambientais e desenvolvimento sustentável da Universidade Federal da Bahia, Barreiras, 2013.

RESUMO

As técnicas de imobilização têm se tornados importantes por proporcionarem a reutilização das enzimas e promover o aumento da estabilidade, reduzir custos e aumentar, em alguns casos a atividade enzimática. Muito da história da bioquímica refere-se ao desenvolvimento de pesquisas em enzimas. As enzimas tem a importante função de catalisar a maioria das reações no organismo, elas são responsáveis pelas reações de biotransformação. Para a utilização de biocatalisadores de menor custo, este trabalho apresenta um estudo relacionado à imobilização de enzimas presentes na *Manihot dulcis*, conhecida popularmente como macaxeira, muito presente na economia brasileira. Estas enzimas foram imobilizadas em diferentes suportes, como o alginato de cálcio e o óxido de titânio. Na identificação e quantificação dos produtos reacionais foram purificadas e analisadas por cromatografia em camada delgada e por cromatografia gasosa (CG-FID), e também foram analisadas por difração de raios x (DRX).

Palavras-chave: *Manihot dulcis*, imobilização e enzima.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Esquema de ligação do substrato no sitio ativo.....	14
Figura 2: Efeito catalítico de uma enzima.	15
Figura 3: Unidades de alginato.....	19
Figura 4: Sítio de ligação do cálcio nos blocos G.	20
Figura 5: Célula unitária do cristal de TiO_2 na fase anatase e na fase rutila. Esferas vermelhas são oxigênio e esferas azuis são titânio.....	23
Figura 6: Estrutura do citrônolol.....	24
Figura 7: Esquema do processo de imobilização por aprisionamento em alginato do complexo enzimático.	32
Figura 8: Difratoograma do suporte alginato de cálcio e do alginato de cálcio com o complexo enzimático imobilizado.....	34
Figura 9: do óxido de titânio calcinado á 500°C	34
Figura 10: Difratoograma do pó de TiO_2 obtidos na temperatura de 500°C	35
Figura 11: Difratoograma do pó de TiO_2 obtidos na temperatura de 500°C	36
Figura 12: Cromatograma do citrônolol.	37
Figura 13: Cromatografia de camada delgada da do citônolol e do produto acetilado.	38
Figura 14: Cromatograma da reação por via química do citrônolol.	38
Figura 15: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl_3) do acetato de 3,7-dimetiloct-6-enila (citrônolol). ...	39
Figura 16: Espectro RMN ¹³ C-BB (500 MHz, CDCl_3) do acetato de 3,7-dimetiloct-6-enila (citrônolol). 40	
Figura 17: Cromatografia de camada delgada das reações.....	41
Figura 18: Cromatograma da reação de acetilação do citrônolol com a presença do complexo enzimático da manipueira imobilizado em alginato.....	42
Figura 19: Cromatograma da reação de acetilação do citrônolol com a presença complexo enzimático da manipueira imobilizado em óxido de titânio.	43
Figura 20: Cromatograma da reação do complexo enzimático imobilizado em alginato de cálcio, com agente acilante acetato de venila.	44
Figura 21: Cromatograma da reação do complexo enzimático imobilizado em óxido de titânio.....	45

SUMÁRIO.

<u>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</u>	<u>10</u>
<u>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.</u>	<u>13</u>
2.1. REFERENCIAL DAS ENZIMAS.....	13
2.2. FATORES QUE INFLUENCIAM NA AÇÃO ENZIMÁTICA.....	15
2.3. IMOBILIZAÇÃO.....	18
2.4. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM POLÍMEROS.....	19
2.5. IMOBILIZAÇÃO EM ÓXIDO DE TITÂNIO.....	22
2.6. ALCOÓIS PRIMÁRIOS	24
<u>CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</u>	<u>25</u>
3.1. COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO.....	26
3.2. OBTENÇÃO DA MANIPUEIRA.....	26
3.3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	27
3.4. SÍNTESE DO CITRATO DE TITÂNIO.....	27
3.5. TRATAMENTO DO SUPORTE E IMOBILIZAÇÃO DA <i>MANIHOT</i>	28
3.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	28
3.7. OBTENÇÃO DO PADRÃO ACETILADO POR VIA QUÍMICA.....	28
3.8. REAÇÕES DE ACETILAÇÃO USANDO COMPLEXO ENZIMÁTICO IMOBILIZADO	29
<u>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	<u>31</u>
4.1. IMOBILIZAÇÃO.....	31
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES.....	33
4.3. ACETILAÇÃO ENZIMÁTICA COM ÁLCOOL PRIMÁRIO, CITRONELOL.....	36
<u>CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>46</u>

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
--	----

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A biotransformação de compostos orgânicos é uma área científica multidisciplinar que utiliza métodos biológicos para a modificação de compostos químicos.

Pasteur em 1860 demonstrou que a fermentação alcoólica ocorria apenas com a presença de células vivas de levedura. A denominação enzima originou-se em 1878 por Kuhne, que tem origem grega e significa “na levedura”, Kuhne acreditava que catalisadores de tipo atuavam apenas dentro de células vivas. Em 1897, o trabalho dos irmãos Buchner mostrou que quando a levedura foi macerada, obtendo-se um extrato, deveria estar totalmente livre de células vivas, porém foi novamente capaz de fermentar o açúcar. Isso mostrou que o extrato continha enzimas catalisadoras da fermentação alcoólica, o que era possível estudar as enzimas agora “*in vitro*” para vários tipos de reações químicas.

As enzimas são utilizadas como catalisadores em biotransformação, pois são versáteis e exigem um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (Dalla *et al.*, 2004). A biotransformação é um termo aplicado para reações com modificações específicas ou interconversões na estrutura química, está pode ser realizada por enzimas presentes nas células ou enzimas imobilizadas em um suporte específico.

A utilização de enzimas na biocatálise tem sido crescente nas últimas décadas, pois vários estudos apresentam que seu uso permite uma alta eficiência, seletividade, além da regioseletividade, quimiosseletividade e a enantioseletividade. Várias reações foram aperfeiçoadas em síntese de moléculas quirais, com um principal interesse farmacológico (Montanari *et al.*, 2000). As enzimas apesar de serem bons catalisadores, necessitam de uma grande atenção, são espécies sensíveis à inativação, que pode ser causada

por vários fatores, tais como, a temperatura, o solvente e o pH. Assim um processo de proteção é indispensável para manter o seu potencial catalítico. Para isso há várias técnicas de imobilizações desenvolvidas, com a finalidade de fornecer estabilidade, facilitarem a recuperação e assim ter a possibilidade de reutilização destes catalisadores (Villen *et al.*, 2007).

Durante muitos anos, vários esforços têm sido empregados não somente no desenvolvimento de biocatalisadores superiores, mas também na procura de biocatalisadores de baixo custo, como por exemplo, a partir do uso de plantas e o cultivo de células vegetais como uma fonte de catalisadores naturais, importante e antigo meio empregado em síntese orgânica. Dentre essas várias fontes naturais apresentam-se as culturas de células de legumes e células íntegras de plantas, que tem com vantagem a manipulação simples, que não requerem a separação do complexo protéico ou a adição de cofatores. Isso demonstra uma alternativa para a investigação de recursos regionais em nosso país, assim tendo uma relevância econômica e ecológica (Machado *et al.*, 2008).

Muitos pesquisadores têm buscado alternativas para diminuir os custos da síntese orgânica. A “química verde” é um exemplo disso, pois visa à utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes, reagentes ou a geração de produtos e subprodutos que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente (Lenardão *et al.*, 2003). Acrescentando um importante aspecto para a química orgânica, que reconhece o importante uso de catalisadores restauráveis. Na fauna e flora do nosso País existem várias plantas, frutas, raízes e sementes a serem pesquisadas para a utilização em uma variedade de reações biocatalíticas, uma delas são os tubérculos da *Manihot dulcis*, popularmente conhecidos como macaxeira, que é de grande importância na economia brasileira (Machado *et al.*, 2008).

A importância econômica da cultura da macaxeira está na produção de raízes tuberosas e flatulentas que representa valioso alimento humano e dos

animais, fabricação de produtos alimentícios ou de aplicação industrial e a produção de álcool. A macaxeira é uma planta de origem brasileira, e a sua cultura é das mais antigas e tradicionais do Brasil. Já era cultivada pelos índios, por ocasião do descobrimento do Brasil. Hoje em dia, é explorada em todo o território brasileiro, e em todos os países sul e centro-americanos e nas Antilhas (SEBRAE., 2011).

A “manipueira” ou “manipeira” obtido da espécie *manihot esculenta* é um líquido de cor amarelada que é extraído da mandioca depois de prensada, durante a fabricação da farinha. Se ela for descartada na natureza, provoca a poluição do solo e das águas (rios, riachos e açudes), causando grandes prejuízos ao meio ambiente e ao homem, que dele necessita para viver. Esse descarte pode ser evitado com a utilização de técnicas corretas de manejo da casa de farinha (SEBRAE., 2011). Esta solução aquosa pode conter uma fonte muito rica em redutases e hidrolases que fornecem uma propriedade importante para a exploração deste rejeito. Vários estudos mostram a manipueira como um bom surfactante (Carvalho *et al.*, 2005).

Este trabalho teve como principal objetivo a imobilização das enzimas presentes na *Manihot dulcis* (Macaxeira) em alginato de cálcio e nanopartículas de óxido de titânio, empregando dois métodos de imobilização. Os suportes utilizados para a imobilização foram caracterizados por difrações de raios x, sem a presença da enzima e com a enzima imobilizada. A atividade enzimática foi testada em reações de acetilação de álcool primário o citrônolol.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Referencial das enzimas.

As enzimas são catalisadores biológicos formadas por longas cadeias de moléculas pequenas chamadas de aminoácidos e possuem em suas estruturas grupos polares tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂, estes grupos estão ligados através de ligações peptídicas que formam ligações complexas de cadeias polipeptídicas para se manter em meio aquoso (Faber *et al.*, 1999). São, portanto, um tipo de proteína com atividades catalíticas, encontradas na natureza em todos os seres vivos.

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que elas catalisam. Por serem catalisadores muito específicos, cada enzima catalisa apenas um tipo de reação (Machado *et al* 2008). Na classificação sistemática internacional as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (tabela 1).

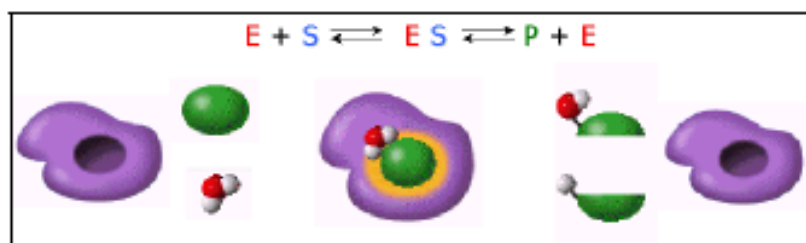
Tabela 1: Classificação das Enzimas.

Classe da Enzima	Tipo de Reação Catalisada
Oxidoredutases	Reações de oxi-redução
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólise.
Liasas	Remoção de grupos para formar ligações duplas.
Isomerase	Reação de isomerização.
Ligases	Formação de ligação entre duas moléculas.

Para que a reação química seja catalisada por enzimas, é necessário que grupos químicos estejam localizados em posições estratégicas, da molécula de interesse. O substrato deve ligar-se a molécula da enzima em uma região específica, chamada de sítio ativo. O sítio ativo é uma cavidade com

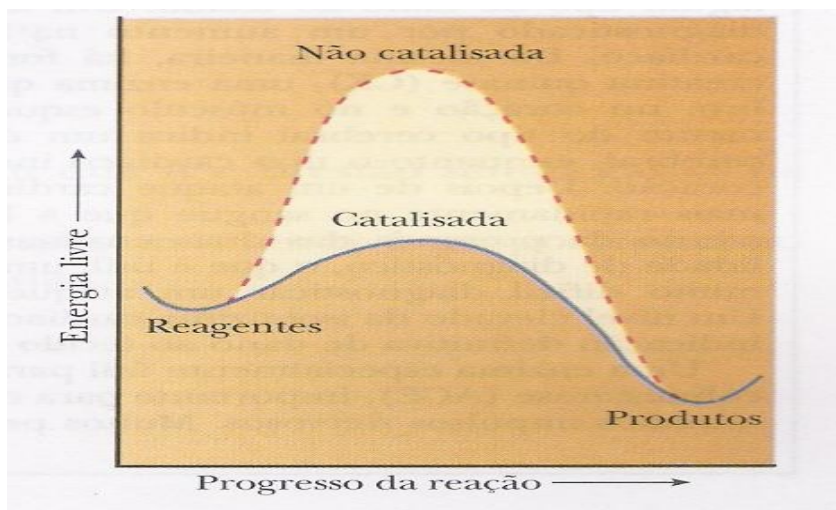
forma definida, aberta na superfície da molécula globular da enzima, constituído por grupos R de aminoácidos, que é favorável a formação do complexo enzima-substrato (ES), que em seguida ocorre à transformação específica do produto (E + P). A Figura 1 demonstra como ocorre esse tipo de reação.

Figura 1: Esquema de ligação do substrato no sitio ativo.



Um catalisador é uma substância que acelera a velocidade de uma reação química e com isso diminui a energia de ativação. Como catalisadores, as enzimas atuam em pequena quantidade e se recuperam com mais facilidade. Não levam em consideração reações que sejam energeticamente desfavoráveis, não modificam o sentido do equilíbrio químico, mas aceleram sua realização (figura 2).

Figura 2: Efeito catalítico de uma enzima.



2.2. Fatores que influenciam na ação enzimática.

Vários fatores influenciam na atividade enzimática, dentro destes estão o pH, a temperatura, os cofatores e a presença de inibidores.

- pH.

A razão pela qual os organismos vivos empregarem tampões para regular o pH, é de que a maioria das enzimas são ativas numa faixa muito estreita (Direi *et al*, 2002). Também as ionizações de aminoácidos que não estão no sítio ativo podem provocar modificações na conformação da enzima. Como a conformação das proteínas depende, em parte, da sua carga elétrica, haverá um pH, no qual a conformação será a mais adequada para a atividade catalítica, este é chamada de pH ótimo, sendo um pH numa faixa entre 6 e 8. Ligeiras mudanças de pH podem provocar a desnaturação da proteína.

- Temperatura.

Na maioria dos casos, com o aumento da temperatura as reações químicas são aceleradas, a velocidade aumenta porque mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Em reações catalisadas por enzimas essa temperatura é elevada até atingir uma temperatura em que a atividade da enzima começa a decair, ocorrendo uma desnaturação protéica, isso ocorre a uma temperatura acima de 70 °C. (Direi *et al*, 2002).

- Cofatores.

Quase um terço das enzimas conhecidas requer um componente não protéico para a sua atividade, denominado de cofator. Estes cofatores podem ser íons metálicos como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou moléculas orgânicas que são denominadas de coenzimas, exemplos são NAD^+ , NADP^+ . A fração protéica de uma enzima na ausência de um cofator é denominada de apoenzima, enquanto que a enzima mais o cofator é chamada de holoenzima (Valter *et al.*, 2011).

- Inibidores.

Algumas moléculas podem inibir a ação catalítica de uma enzima estes são os inibidores. Podem ocupar temporariamente o centro ativo por semelhança estrutural com o substrato original, que é chamado de inibidor competitivo. Quando há a alteração da conformação espacial da enzima, impedindo a união com o substrato é chamada de inibidor não competitivo (Valter *et al.*, 2011).

Em muitos casos a eliminação da água promove a deformação da estrutura da enzima levando a sua inativação, porém em condições naturais as enzimas apresentam grandes atividades catalíticas em solução aquosa. Desta forma para que as enzimas sejam ativas em meio anidro é necessário uma pequena quantidade de água para manter a conformação ativa, isso é denominado de “capa essencial de água” e o resto podendo ser substituído por

um solvente orgânico, estes são mais indicados pois são hidrofóbicos (Machado *et al.*, 2008).

Quando faz-se uma substituição de uma parcela de água por um solvente orgânico, muitas vantagens são observadas nas reações biocatalíticas. Os substratos orgânicos apresentam uma maior solubilidade em solventes orgânicos, possuem uma maior facilidade na recuperação do produto final e eliminam as reações laterais típicas do meio aquoso como a hidrólise e a racemização do substrato e produto (Carrera *et al.*, 2000).

As principais vantagens de se utilizar enzimas em síntese orgânica são (Barcellos *et al.*, 2011):

- Quimiosseletividade: Uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funções que poderiam reagir em condições de catálise química, são preservadas;
- Regiosseletividade: Devido à complexa estrutura tridimensional do sítio ativo da enzima, e de acordo com a interação espacial do substrato, a reação pode ocorrer em regiões específicas do substrato;
- Enantiosseletividade: Como as enzimas são formadas por L aminoácidos, que são moléculas quirais, a enzima, bem como o sítio ativo também apresentam quiralidade. Como consequência deste ambiente, a quiralidade presente no substrato é reconhecida. Assim, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo.

As enzimas mais utilizadas como biocatalisadores em síntese orgânica são as hidrolíticas denominadas de lipases, pois são muito abundantes na natureza, de baixo custo e disponíveis comercialmente. Apresenta como destaque a sua capacidade de adotar diferentes conformações e aceitar

distintos substratos, além de permitir a substituição de um solvente aquoso por um solvente orgânico, que possui a capacidade de aceitar diferentes nucleófilos.(Barcellos *et al.*, 2011).

2.3. Imobilização.

Foi na década de 60 que surgiu a ideia de imobilização de enzimas. A imobilização de enzimas é uma técnica de fixar enzimas (por meios físicos ou químicos) a suportes inertes insolúveis. Convencionalmente, enzimas são imobilizadas em matrizes sólidas, embora sejam também utilizados alguns polímeros que podem ser solúveis ou insolúveis dependendo do pH, temperatura ou adição de espécies químicas (MONDAL *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, quando comparado com sua forma livre. A enzima imobilizada deverá ter uma alta atividade catalítica e também não deverão ocorrer modificações estruturais em sítio ativo (Silva *et al.*, 2008).

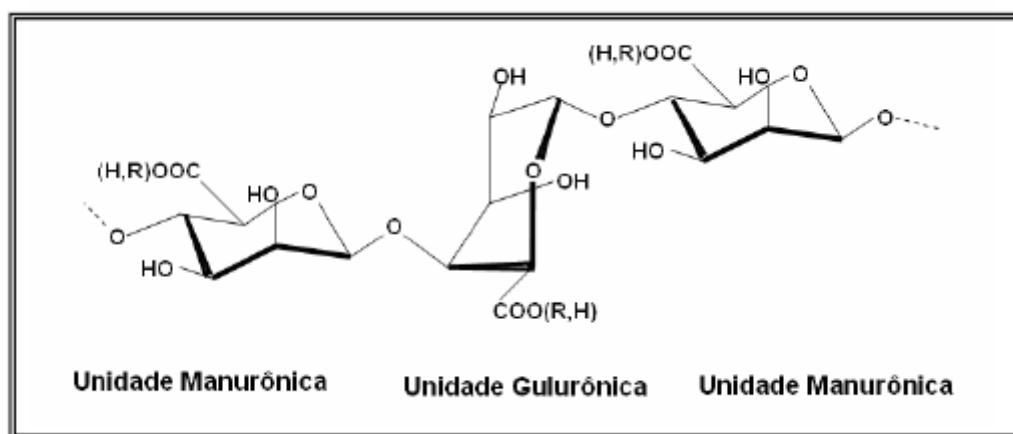
Uma das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização da preparação enzimática, que tem implicações no custo do processo catalítico enzimático, além de possibilitar a execução de processos contínuos e a fácil separação da enzima dos produtos (SALIS *et al.*, 2005). De outra parte, as desvantagens mais notórias seriam a aleatoriedade da interação suporte-enzima, a perda parcial ou total da atividade, devido aos efeitos funcionais, do suporte e reagentes utilizados durante os processos experimentais (Silva *et al.*, 2008).

2.4. Imobilização de enzimas em polímeros.

A imobilização de enzimas em polímeros pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (Dalla *et al.*, 2004).

O alginato é um polissacarídeo linear constituído por unidades monoméricas, o ácido β -D-manurônico(M) e o ácido α -L-gulurônico(G). As formas para estes monômeros estão apresentadas na Figura 3, com destaque a estrutura tridimensional destas moléculas (Bressel et al, 2007). As composições químicas do alginato variam de acordo com a espécie de alga.

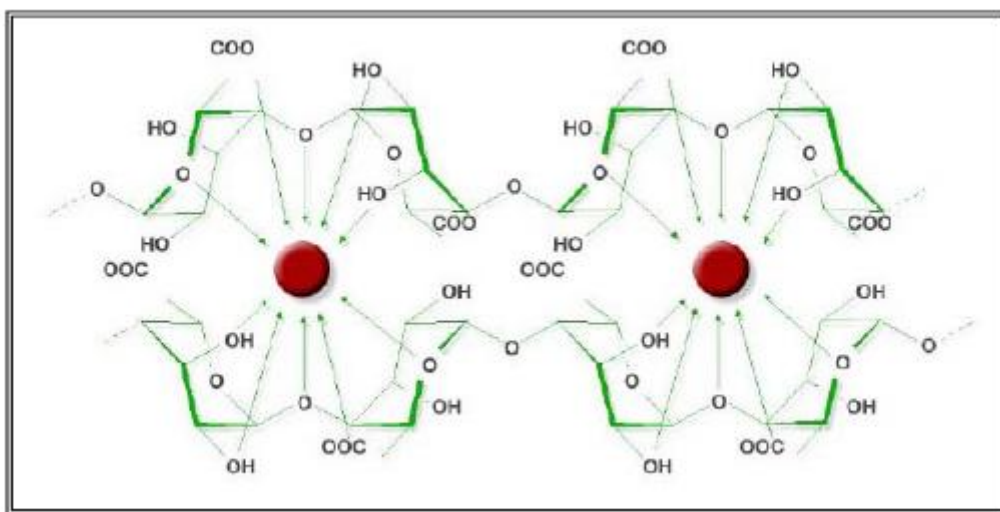
Figura 3: Unidades de alginato.



Para formar um gel o alginato deve conter um número suficiente de monômeros gulurônicos para poder reagir com um cátion (normalmente o Ca^{2+}). Quando as cadeias do bloco G se alinham lado a lado formando um “berço” em forma de diamante, o qual tem dimensão ideal para acomodar em

seu interior um íon cálcio gerando uma estrutura dimérica (figura 4) (Bressel et al, 2007).

Figura 4: Sítio de ligação do cálcio nos blocos G.



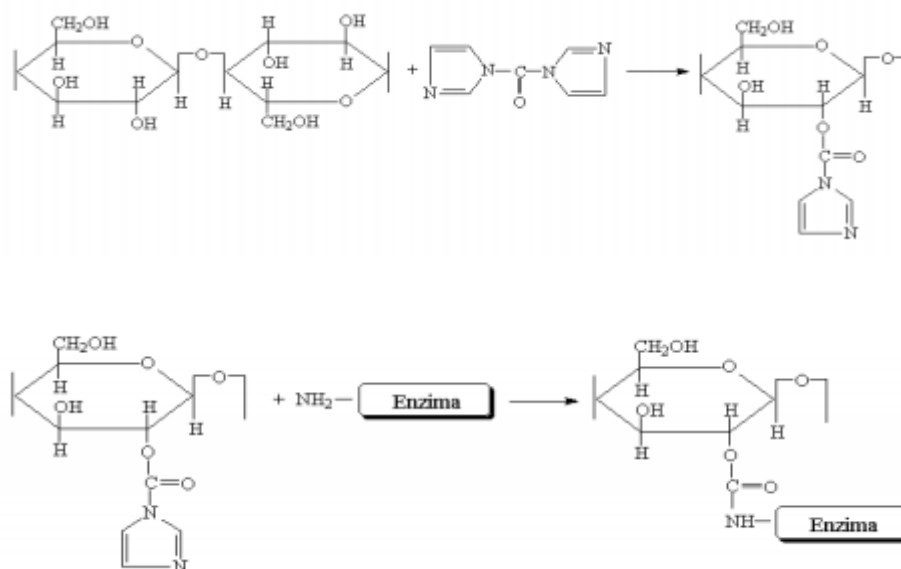
GROPO *et al.* 2009 mostra a importância do biopolímero alginato de cálcio que tem sido bastante estudado, na indústria é utilizado como emulsificante e também para o aumento da viscosidade. Quando se trata de imobilização de enzimas e também como uma barreira contra a ação da umidade e do oxigênio em produtos alimentícios. Na presença de solução de cloreto de cálcio o alginato apresenta propriedades de formar um gel firme, pois o cálcio induz a um estado de equilíbrio, que é o modelo de “egg-box” (KawAgutu *et al.* 2008).

Segundo Suave *et al.* 2006, o material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas. Pois ele deve ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula.

Santos et al.,1997 relata que foram realizados estudos sobre a atividade de diferentes lipases (lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor javanicus* e Lipolase) imobilizadas em gel de pectina, avaliando sua atividade catalítica em meio orgânico. Foram avaliadas as atividades das enzimas imobilizadas neste gel através da reação de esterificação do ácido láurico com o n-pentanol. Foram utilizados quantidades equimolares dos substratos. As reações foram realizadas em uma incubadora sob agitação a temperaturas controladas. Os resultados demonstraram a viabilidade do uso do gel de pectina como suporte para a imobilização de enzimas e sua aplicação em meio orgânico.

No trabalho de Gomes et al. 2006 demonstra as propriedades catalíticas da lipase livre e imobilizada em celuloso em um meio aquoso, conforme o Esquema 1. A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva. Para verificar as alterações causadas nas propriedades originais da lipase livre, foi determinada a influência do pH e da temperatura na das lipases livre e imobilizada, bem como estimados os parâmetros cinéticos. Este trabalho verificou um perfil típico dos sistemas imobilizados, tendo em vista que a enzima livre exerce sua atividade catalítica em um meio homogêneo, enquanto a enzima imobilizada em um suporte sólido deve agir em um meio heterogêneo. Houve a diminuição da atividade das enzimas imobilizadas, isso deve-se às mudanças conformacionais na sua estrutura terciária e aos impedimentos estéricos.

Esquema 1: Reação de carbonilação da celulose com carbonildiimidazol e ligação covalente da enzima com celulose quimicamente modificada com carbonildiimidazol.



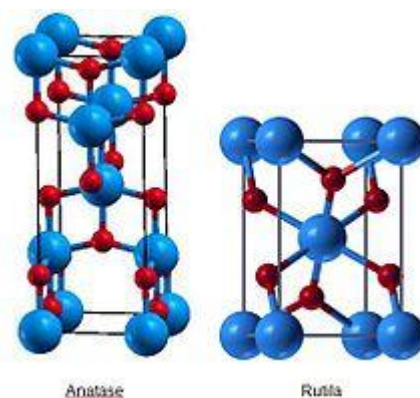
O alginato apresenta propriedades importantes como: resistência mecânica, porosidade, uniformidade do gel, biocompatibilidade influência nas células encapsuladas. O alginato é um polissacarídeo obtido de algas pardas, descoberto por um químico inglês E. C. C. Stanford no ano de 1883 (Bressel *et al*, 2007).

2.5. Imobilização em óxido de titânio.

O uso de nanopartículas é um campo muito estudado e que tem avançado muito nestes últimos anos, pois possuem propriedades físicas únicas, que permite a sua aplicação em vários campos, tais como na biomedicina, no desenvolvimento de sensores e na purificação de águas (Johnson *et al*. 2008).

O óxido de titânio (TiO_2), possui um conjunto de propriedades bastante peculiares, duas destas são: por ser um óxido atóxico e quimicamente inerte. O óxido de titânio se apresenta em três fases cristalinas, a anatase, o rutilo e a broquita, sendo esta última bastante instável e de pouco interesse. Já a fase de maior interesse é a anatase, pois apresenta maior atividade catalítica.

Figura 5: Célula unitária do cristal de TiO_2 na fase anatase e na fase rutila. Esferas vermelhas são oxigênio e esferas azuis são titânio.



Sousa *et al.* 2005. Utilizaram a imobilização da glicose oxidase em filmes nanocristalinos e mesoporosos de TiO_2 , utilizando partículas de ouro. Para a modificação dos filmes nanocristalinos de dióxido de titânio, foi necessário a síntese do sal de dibrometo de 1,1'-bis(4-carboxibenzil)-4,4'-bipiridina, para então modificá-lo com as enzimas glicose oxidase, as nanopartículas de ouro serviram para favorecer a interação entre a enzima e o eletrodo. Estudos envolvem o uso de substratos nanoestruturados como o TiO_2 , pois ele apresenta uma estrutura regular, uma alta atividade enzimática por unidade de área e uma boa estabilização da enzima.

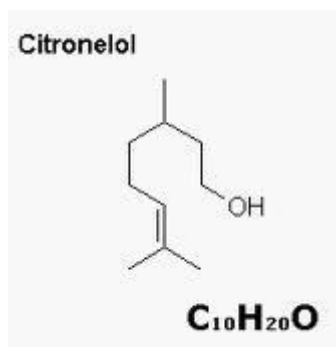
Zhu Yihua *et al.* 2008. Sintetizou o óxido de titânio baseado no método sol-gel, obtendo um precursor polimérico que mostrou boa estabilidade e uma estrutura bem organizada. O TiO_2 foi escolhido por ser biocompatíveis, estável e ambientalmente seguros e que para o Peroxidase de rábano (HRP) fornece

um microambiente favorável para a troca de elétrons com o eletrodo. Em geral, este tipo de estrutura é favorável para a utilização em biossensores. Onde o tamanho dos poros das estruturas pode ser precisamente controlada e prontamente ajustado mudando apenas o tamanho do colóide e espessura do molde. Por fim foi constatado o TiO_2 que pode ser utilizado, quando se refere a imobilização de enzimas.

2.6. Alcoóis Primários

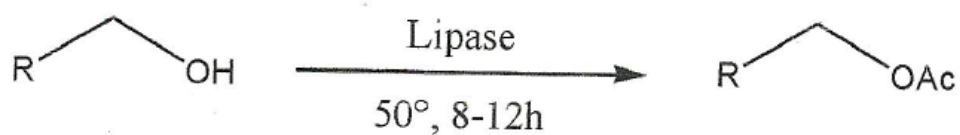
O álcool é uma classe de compostos orgânicos que possui, na sua estrutura, um ou mais grupos de hidroxilas ("OH") ligados a carbonos saturados. Os álcoois primários têm o grupo hidroxila ligado a um carbono primário, como por exemplo, o citrônolol, representado pelo figura 6, pg. 25.

Figura 6: Estrutura do citrônolol



Acetilação descreve uma reação que introduz um grupo funcional acetila em um composto orgânico. Uma das metodologias utilizadas em reações com a presença de álcoois é a de acetilação com cloretos ácidos e anidridos, sendo o anidrido acético o mais utilizado nas reações de acetilação

Esquema 2: Reação geral da acetilação enzimática de alcoóis primários.



Nanda *et al.* (2004) mostra reações de transesterificação utilizando uma vasta variedade de estruturas de alcoóis primários aromáticos e alifáticos, isto na presença da enzima CAL-B (*Candida rugosa*) imobilizada em resina acrílica com macroporos, obtendo-se um produto com um bom rendimento e um pequeno intervalo de tempo. Foi observada uma alta quimiosseletividade.

CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia a que foi utilizada neste projeto se procedeu com as seguintes etapas:

3.1. Coleta de material botânico.

A macaxeira (*M. dulcis*) foi coletada na fazenda Caju localizada no município de Barreiras, nel da soja Km 35, para a observação do potencial enzimático bem como avaliar a seletividade.

3.2. Obtenção da manipueira.

Inicialmente, aproximadamente 5 kg dos materiais vegetais foram lavados com uma solução de hipoclorito de sódio 5% por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram descascada e ralada. Após obtenção do material na forma de massa, esse foi prensado em um tecido especial (esterilizado), separando desta forma, o resíduo da parte líquida (manipueira + goma). A manipueira foi colocada em um Béquer, foram obtidos cerca de 1L de manipueira, que foi deixada em repouso, para completa decantação da goma, obtendo-se aproximadamente 0,8 L da manipueira separada da goma.

3.3. Imobilização Enzimática.

Para o processo de imobilização da manipueira foi adotado o procedimento adaptado da metodologia de Kalogeris por MACHADO *et al.*, (2008). O método consiste em misturar alginato de cálcio com extrato aquoso do vegetal, em proporção determinada, e agitação constante à temperatura ambiente por 3 horas até a completa formação de um gel de filme. A solução resultante foi então adicionada a outra solução de CaCl_2 5 % utilizando uma seringa, para formação das esferas. Após o fim do gotejamento da mistura, foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 12 horas para uma maior consistência das mesmas. Ao fim deste período, as esferas foram filtradas e lavadas até completa retirada dos sais e em seguida lavada com acetona e secas a temperatura ambiente para obtenção cerca de 6,369 g das enzimas imobilizadas.

3.4. Síntese do citrato de titânio.

O Citrato metálico foi sintetizado a partir da dissolução de alcóxidos, nitratos e carbonatos de cátions metálicos envolvidos na formação do óxido desejado TiO_2 , em ácido cítrico sob agitação e aquecimento. Proporções estequiométricas dos cátions foram utilizadas de modo a reproduzir na síntese química a composição final do óxido. Após a formação dos citratos, a adição de um álcool polihidroxilado, o etileno glicol, com o aumento da temperatura a aproximadamente 90 °C proporcionou a poliesterificação das cadeias e formação de uma resina viscosa. Então a resina foi calcinada a uma temperatura de 500 °C por duas horas, e caracterizados em difração de raios x, para a confirmação da fase cristalina desejada.

3.5. Tratamento do suporte e imobilização da *Manihot*.

O suporte de óxido de titânio (tratado termicamente a 500°C) foi esterificado com glicidol, de acordo com a metodologia de GUIRÁN, 1988 (25°C, meio alcalino, 5,2 μ moles de glicidol/g de suporte, agitação mecânica por 12-15 h), seguido da oxidação do gel gliceril-suporte com periodato de sódio (2 h, 25°C), produzindo géis glioxil-suporte. A densidade superficial de grupos aldeídos no suporte é controlada pela quantidade de periodato utilizado (para cada μ Eq/ mL de gel desejado foi utilizado 214 μ g de periodato de sódio). Na sequência, 0,100g do suporte ativado foi suspenso em uma solução enzimática (razão volume de gel e volume total de 1:10), preparada em solução tampão fosfato 100 mM, pH 7,5. A suspensão foi suavemente agitada, em agitador recíproco, a 25°C, por 24 h.

3.6. Difração de Raios x.

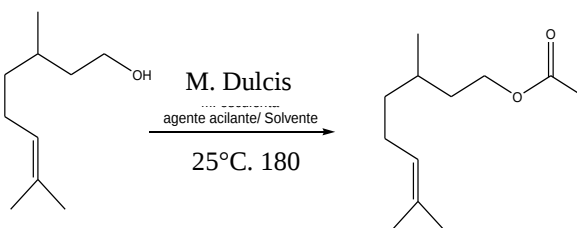
Os difratogramas das enzimas imobilizadas e dos suportes foram obtidos em um difratômetro de raios x Rigaku Ultima 4 com gerador de raios x produzidos a partir de filamento de tungstênio e filtro de cobre ($\lambda=1,5406$ Å) em potência e corrente de 40 kV e 30 mA, respectivamente, geometria θ -2 θ no intervalo 2 θ de 15° a 75° com passo mínimo de 0,02 graus, em varredura contínua com velocidade de 1°. min^{-1} .

3.7. Obtenção do padrão acetilado por via Química e caracterização por CG-FID.

O padrão em estudo foi obtido através de síntese química a partir do padrão do citronelol através da síntese de 1,60 mmol do álcool, 2,70 mmol de

piridina, 5,40 mmol de anidrido acético e 1 mL de diclorometano. Foi deixado sob agitação em temperatura ambiente durante 4 horas. Para a retirada do excesso de piridina foi realizado um tratamento com sulfato de cobre e duas partições de 20 mL de clorofórmio, a fase orgânica foi lavada com água para retirar o excesso de sulfato de cobre, foi evaporado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo para obtenção do produto acetilado por via química 251,7 mg. A purificação foi realizada através de uma coluna cromatográfica de sílica e como fase móvel utilizada foi o hexano. Este padrão foi analisado por CG-FID, nas seguintes condições analíticas: temperatura do injetor 140°C, fluxo de 1 mL/min, Temp. inicial 90°C, 8°C por minuto e Tem. final 200°C. e identificado por RMN¹H e ¹³C, estas análises foram realizadas com a colaboração da Universidade Federal do Ceará.

3.8. Reações de acetilação usando complexo enzimático imobilizado



As reações de biotransformação foram realizadas conforme metodologia descrita por Machado *et al.* (2008), A uma solução do substrato selecionado (152 µL, 0,82 mmol), e do complexo enzimático da manipueira (200 mg), em solvente seco (4,0 mL), adiciona-se 2 equivalentes do agente acilante. A reação foi agitada a 180 rpm sob temperatura ambiente por 120 hrs, tomando alíquotas regularmente que será analisada por CG-FID. Em seguida são filtradas as enzimas e lavadas com CH₂Cl₂ (3×10 mL). O solvente foi evaporado por destilação, a pressão reduzida obtendo o produto.

Tabela 21: Condições reacionais do citrônolol do efeito do agente acilante

<i>Item</i>	<i>Enzima</i>	<i>Acila</i>	<i>eq.</i>	<i>Solvente</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t (h)</i>	<i>c %</i>
1	Manihot em alginato	Anidrido acético	2	Hexano	25	120	47
2	Manihot em TiO ₂	Anidrido acético	2	Hexano	25	120	59
3	Manihot em alginato	Acetato de vanila	2	Hexano	25	120	68
4	Manihot em TiO ₂	Acetato de vanila	2	Hexano	25	120	85

C % = conversão em massa do produto acetato.

T (h) = tempo de reação.

T (°C) = temperatura.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Imobilização.

- **Alginato de cálcio**

A técnica adotada para a obtenção dos produtos imobilizados, apresenta como características positivas a reutilização das enzimas, promove o aumento da estabilidade, consequentemente reduzindo os custos. Neste trabalho foi desenvolvido o processo de aprisionamento no interior de um suporte poroso (alginato), uma metodologia simples, de baixo custo e por ser reprodutível.

A imobilização do complexo enzimático foi desenvolvido utilizando alginato de cálcio (1%) de baixa viscosidade, como suporte adicionado-o na manipueira e sob agitação até formar um gel firme. Com o auxílio de uma seringa de 50 mL, essa mistura é gotejada lentamente a uma solução de cloreto de cálcio a 5% sendo este o agente aglutinante, levando a formação de grânulos, estes foram deixados em repouso para maior consistência das esferas. Em seguida as esferas foram lavadas com água destilada até a completa retirada dos sais de cloreto de cálcio, e por fim foram lavadas com acetona e logo após colocadas em um recipiente, para a eliminação da água em excesso. Esse processo está ilustrado na figura 7.

Figura 7: Esquema do processo de imobilização por aprisionamento em alginato do complexo enzimático.



- **Óxido de Titânio.**

Para o óxido de titânio utilizou-se aproximadamente 1 g do óxido de titânio foi tratada com 5,2 μ moles de glicedol, este foi deixado sob constante agitação durante 15h, logo após foi adicionado cerca de 0,214 g de periodato de sódio, para a retirada dos grupos aldeídos em excesso, logo em seguida o produto foi deixado em repouso para que houvesse a decantação, com isso foi retirado o material que estava em suspensão e logo adicionado cerca de 10 mL

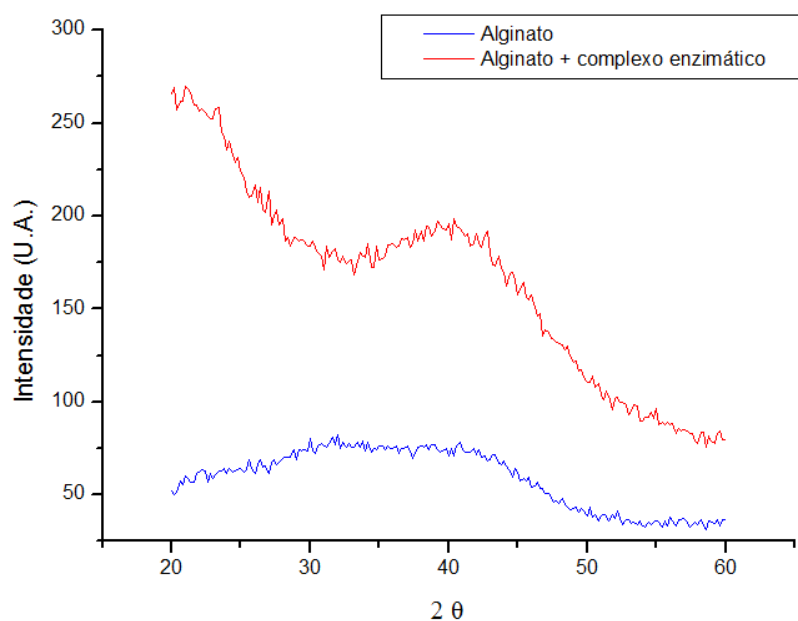
da manipueira contendo o complexo enzimático da manipueira. Esta mistura ficou sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente, por fim o suporte foi lavado com uma solução tampão fosfato de pH 7,5 e repetiu-se o processo, deixando o material decantar e a retirada do material em suspensão.

4.2. Caracterização dos suportes.

- **Alginato de cálcio**

Para a caracterização do suporte utilizou-se a técnica de difração de raios x do suporte alginato e também da imobilização do complexo enzimático em alginato é apresentado na figura 8. Podemos observar que não há a formação de picos característicos de um material com estrutura bem organizada e sim o surgimento de bandas, isso caracteriza um material desordenado. Com isso não foi possível fazer a caracterização eficaz do material, já que a ficha JPCDS não consta no banco de dados do equipamento, deste tipo de material.

Figura 8: Difratoograma do suporte alginato de cálcio e do alginato de cálcio com o complexo enzimático imobilizado.



- **Óxido de Titânio.**

A caracterização do suporte óxido de titânio, foi realizada por difração de raios x, para assim termos a identificação das fases cristalinas obtidas. O difratograma da estrutura obtida está representado nas figuras 10 e 11.

Figura 9: do óxido de titânio calcinado á 500°C.



Podemos observar que obtivemos a formação da fase desejada do TiO_2 quando comparadas com as fichas JPCDS, 00-001-0562 e a 00-001-1292 , referentes a fase anatase e rutilo do óxido de titânio. Sendo que a maioria dos picos correspondentes é da fase desejada.

Observando a figura 11, difratograma do TiO_2 com o complexo enzimático imobilizado, observamos agora o surgimento apenas a fase anatase do óxido, conforme a comparação com a ficha JPCDS 00-001-0562. Podemos dizer que a fase rutilo era menor abundancia e quando foi recoberta pelo complexo enzimático da manipeira, prevaleceu apenas a fase anatase, de maior abundancia.

Figura 10: Difratograma do pó de TiO_2 obtidos na temperatura de 500 °C.

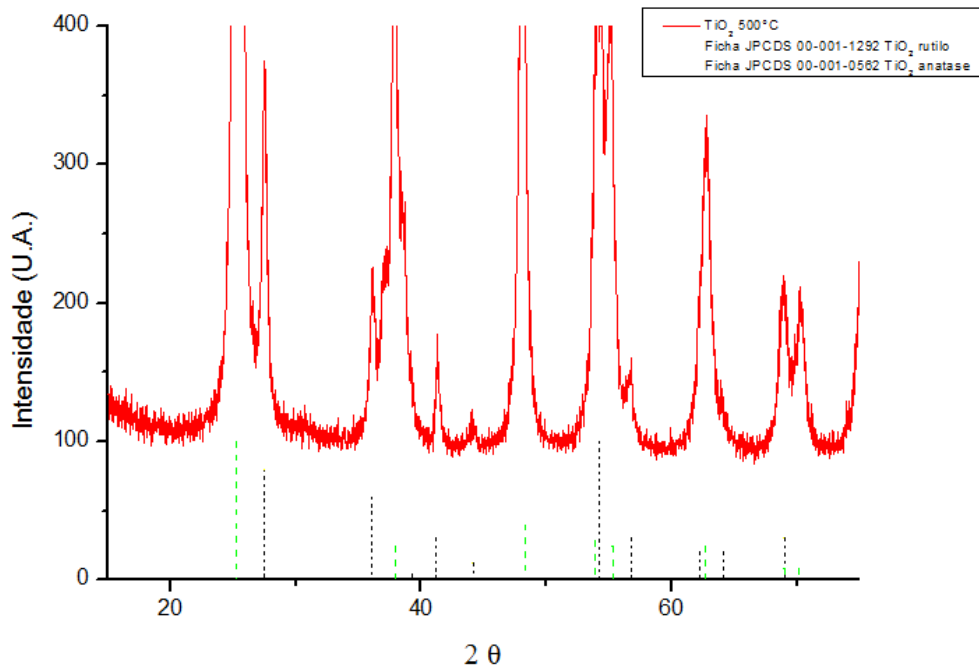
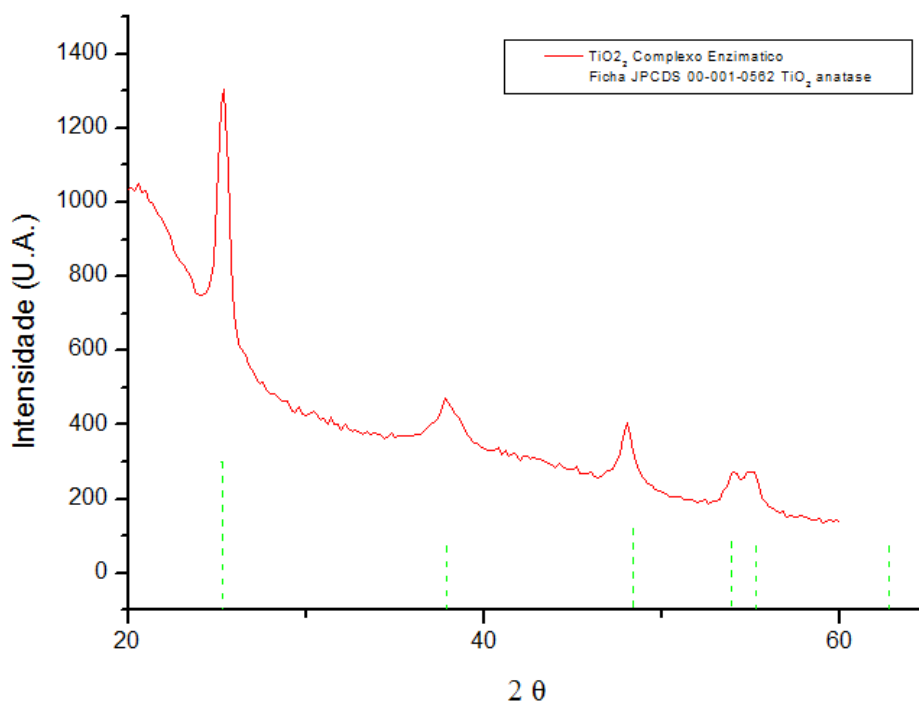


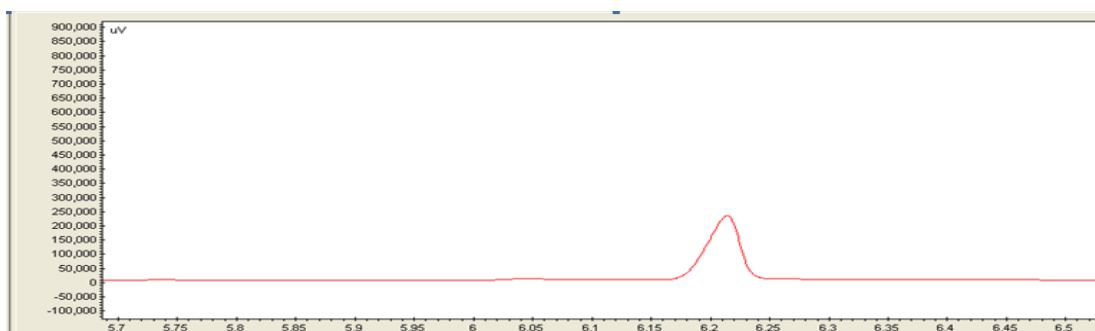
Figura 11: Difratoograma do pó de TiO_2 obtidos na temperatura de 500 °C como complexo enzimático imobilizado.



4.3. Acetilação enzimática com álcool primário, citronelol.

Para verificar a eficiência do complexo enzimático imobilizado, realizou-se reações com um álcool primário, o monoterpeno citronelol. Para isso fez-se inicialmente a verificação do tempo de retenção do álcool escolhido. A figura 12, mostra o cromatograma do álcool citronelol. Utilizando a técnica de CG-FID com as condições analíticas descritas no item 3.7. O tempo de retenção foi de $T_r = 6,21$ min com um rendimento de 96,08% do álcool.

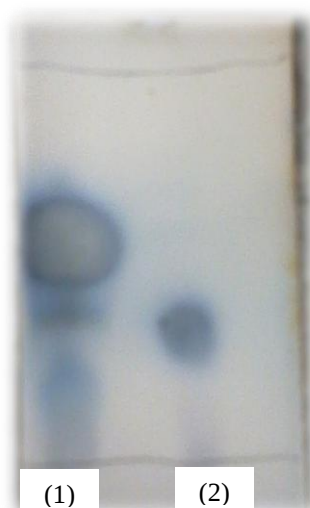
Figura 12: Cromatograma do citrônolol.



Procedimento geral por via química para a acetilação do citrônolol.

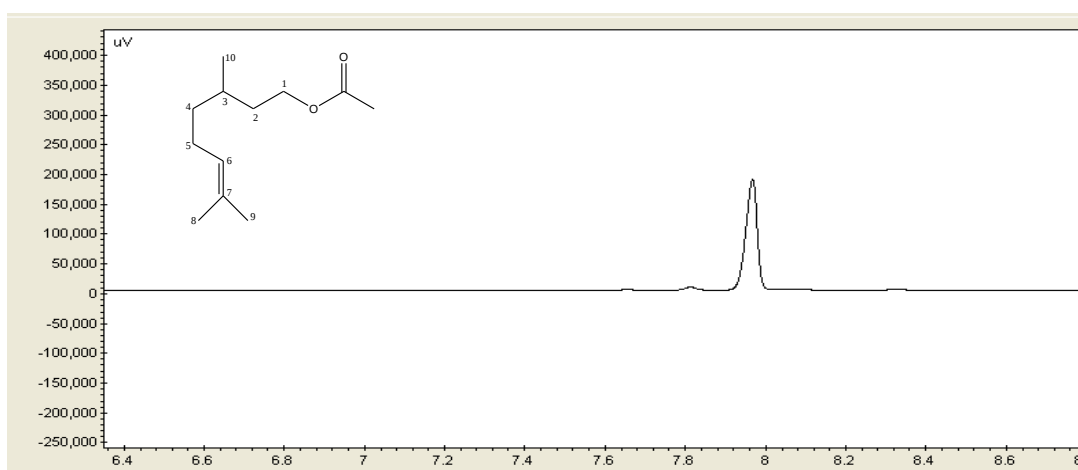
Para a acetilação por via química do acetato de 3,7-dimetiloct-6-enil foi utilizando 300 μL do álcool citrônolol com 500 μL de piridina, 1000 μL do agente acilante anidrido acético e 1000 μL de diclorometano. Após feito o procedimento obteve-se um material reagido com 304.5 mg, por isso foi necessário realizar a purificação. A purificação do material se deu por coluna cromatográfica em sílica gel e como eluente hexano, após concentração das frações obteve-se um rendimento prático de 84% (251,7 mg), de um líquido incolor, a figura 13 mostra a formação do material acetilado e a ausência do álcool de partida, quando faz-se a comparação do citrônolol (1) e do produto acetilado (2), mediante a realização de uma placa de camada delgada (CCD).

Figura 13: Cromatografia de camada delgada da do citonelol e do produto acetilado.



Utilizando a técnica de CG-FID, nas condições analíticas descritas no item 3.7. O tempo de retenção foi de $T_r = 7,97$ min com uma pureza de 98,22% referente ao produto da acetilado e sem a presença do álcool.

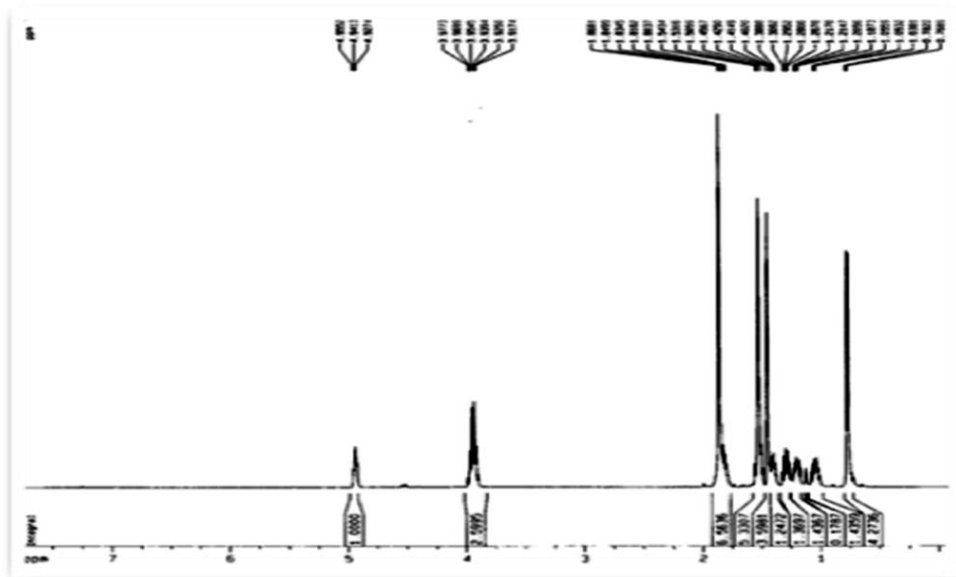
Figura 14: Cromatograma da reação por via química do citonelol.



O produto reacional acetilado foi identificado por espectroscopia de RMN ^1H tendo como solvente o CDCl_3 , com frequência de 500 MHz, o espectro de hidrogênio, ilustrado na figura, mostra deslocamento químico em δ 1,98 do

singleto dos três hidrogênios característicos de um CH_3 , já em 0,86 analisa-se o dubleto que representa os hidrogênio que estão na ligação da metila do carbono 10, em 1,63 observa-se um singleto referente aos hidrogênios das metilas próximas a dupla ligação, em 5,04 observa-se um multipletto referente ao hidrogênio que esta na ligação dupla, em 4,04 um multipletto referente a dois hidrogênios que estão próximos a ligação com o oxigênio, em 1,60 observa-se um singleto referente ao hidrogênio do carbono 3, em 1,41 um multipletto referente aos hidrogênios ligados ao carbono 2, em 1,94 um multipletto referente aos hidrogênios ligados ao carbono 5, em 1,13 observa-se um multipletto que representa os hidrogênios ligados ao carbono 4.

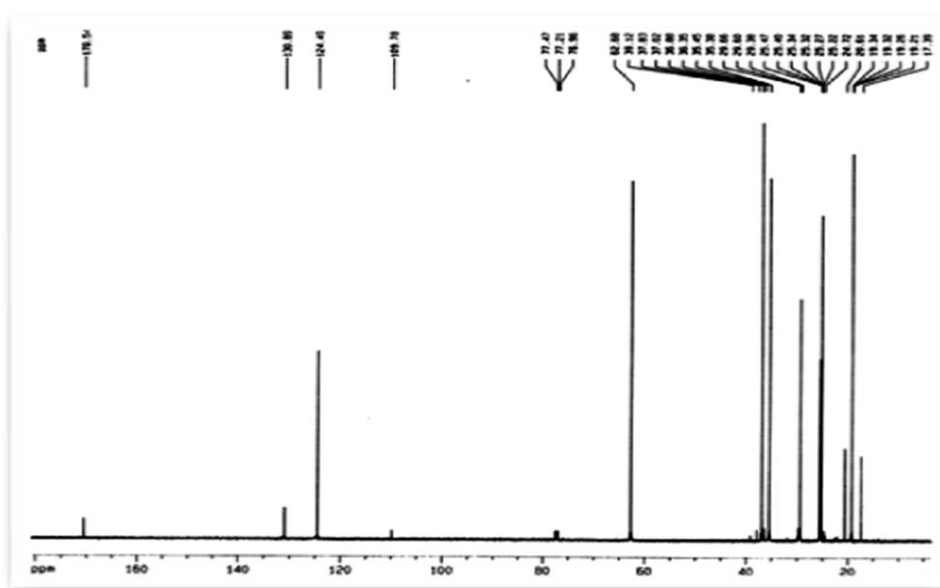
Figura 15: Espectro de RMN1H (500 MHz, CDCl_3) do acetato de 3,7-dimetiloct-6-enila (citronelol).



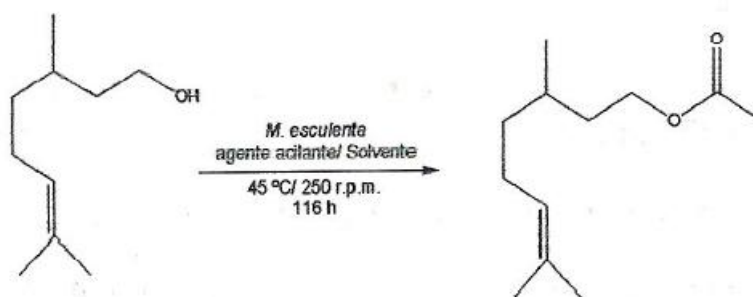
O espectro de RMN ^{13}C do material acetilado, as condições de realização do equipamento corresponde com o uso do solvente o CDCl_3 , com uma frequência de 125 MHz, representado na figura 16, mostra as linhas espectrais em δ 63,1 referente ao carbono 1, 35,6 referente ao carbono 2, em

29,6 do carbono 3, em 37,1 do carbono 4, em 25,5 referente ao carbono 5, em 124,7 referente ao carbono 6, em 131,4 que é o carbono 7, em 17,7 do carbono 8, em 25,8 do carbono 9, em 21,1 do carbono 10, em 171,2 é o carbono que faz dupla ligação com o oxigênio, por isso está mais deslocado (C=O) e também em 19,5 que mostra os carbonos que fazem as ligações de CH₃. Assim confirma-se a estrutura do acetato de 3,7-dimetiloct-6-enil referente ao produto da acetilação por via química do citrônolol.

Figura 16: Espectro RMN13C-BB (500 MHz, CDCl₃) do acetato de 3,7-dimetiloct-6-enila (citrônolol).



- Reações enzimáticas do citrônolol.

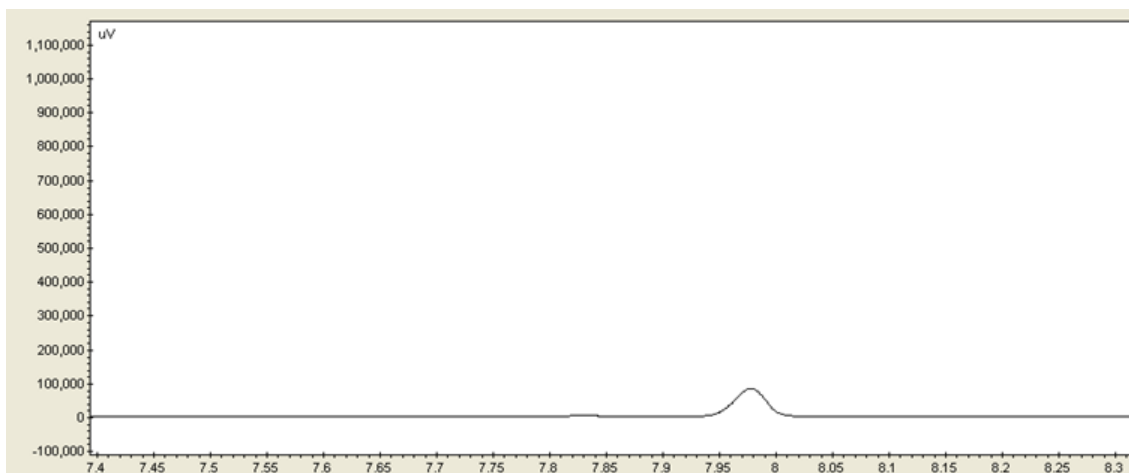


As reações utilizando os complexos enzimáticos imobilizados, emprega-se cerca de 200 mg do complexo, com 152 μL do citrônolol, 300 μL do anidrido acético e 4 mL de hexano. Estas foram deixadas sob constante agitação durante 120 horas (5 dias). Essas reações foram tratadas, retirando-se o excesso de solvente. Para verificar se o produto acetato foi formado, fez-se a cromatografia de camada delgada, como mostra a figura 17 pg. 38, onde podemos observar que a reação realmente ocorreu. Utilizando a técnica de CG-FID ocorreu nas condições analíticas descritas no item 3.7 O tempo de retenção do complexo enzimático imobilizado em alginato foi de $T_r = 7,98$ min com uma conversão de 97,90% (figura 20) referente ao produto acetilado e sem a presença do álcool.

Figura 17: Cromatografia de camada delgada das reações.



Figura 18: Cromatograma da reação de acetilação do citrônolol com a presença do complexo enzimático da manipueira imobilizado em alginato.



Já o cromatograma da reação do complexo enzimático da manipueira imobilizado em óxido de titânio, mostra que a reação não teve a conversão de todo álcool, somente em uma parte ocorre a reação. As mesmas condições foram utilizadas na coluna dos cromatogramas anteriores. Observamos o surgimento de um pico em um tempo de retenção de $Tr_1 = 6,21$ min com a presença de 18,70% que se refere a presença do álcool e outro pico em um tempo de retenção $Tr_2 = 7,97$ min com uma conversão de 79,80% que mostra que a maior parte do álcool foi acetilado, porém agora com um menor rendimento, quando comparado com o complexo enzimático da manipueira imobilizado em alginato. (Figura 1). Isso pode ser ao fato que a massa do TiO_2 é maior, tendo uma menor quantidade de complexo enzimático imobilizado assim seria necessária uma maior massa do produto imobilizado presente na reação para um maior rendimento.

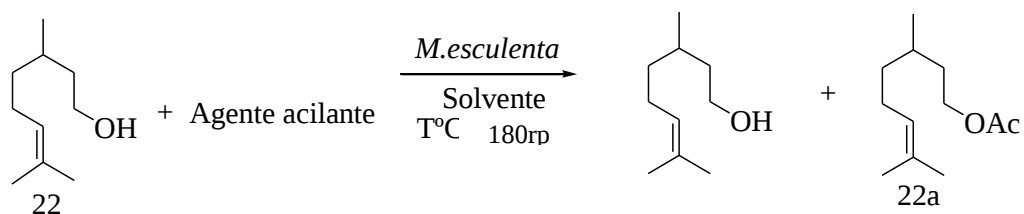


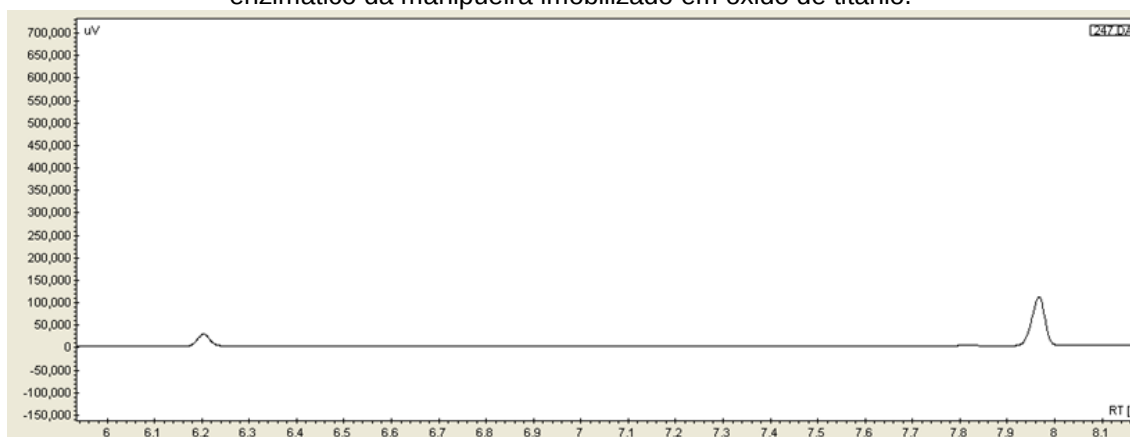
Tabela 3: Acetilação enzimática do citrônolol variando o agente acilante com o complexo enzimático da manipueira.

<i>Item</i>	<i>Solvente</i>	<i>Acilante</i>	<i>eq.</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t (h)</i>	<i>c^{a,b} %</i>
1	Hexano	Anidrido acético	2	25	120	97,90
2	Hexano	Anidrido acético	2	25	120	78,90
3	Hexano	Acetato de vanila	2	25	120	0
4	Hexano	Acetato de vanila	2	25	120	0

C^{a,b} % = Conversão do produto acetato.

Os rendimentos das reações estão todos descritos na tabela 3, onde os itens 1 e 3 correspondem as reações de acetilação utilizando a manipueira imobilizada em alginato, os itens 2 e 4 são da manipueira imobilizada em TiO₂ respectivamente. Podemos observar que o melhor rendimento foi da enzima da manipueira imobilizada no suporte alginato, já o suporte de óxido de titânio teve um rendimento menor, porém ainda considerável. Já quando se realizou a mudança do agente acilante não ocorreu a reação com nenhum suporte que continha o complexo imobilizado. Por causa do menor potencial do agente acilante

Figura 19: Cromatograma da reação de acetilação do citrônolol com a presença complexo enzimático da manipueira imobilizado em óxido de titânio.



Em procedimento testou-se a aplicação de outro agente acilante o acetato de vanila, para verificar a capacidade de transferência do grupo acila presente no complexo enzimático. Utilizou-se a mesma metodologia designada com o anidrido acético. Analisando os cromatogramas das figuras 20 e 21, os quais representam o cromatograma da reação do álcool com o complexo enzimático imobilizado em alginato e óxido de titânio, tendo como agente acilante o acetato de vanila, não obtivemos o produto acetato como era o esperado. Este fato deve-se que o acetato de vanila ser um agente acilante fraco em comparação com o anidrido acético. Foram utilizadas as mesmas condições do CG-FID das análises anteriores, porém agora observamos um pico surgiu em um tempo de retenção de $T_r = 6,21$ min, o que caracteriza apenas o aparecimento do álcool citronelol e que não à presença de nenhum outro pico referente ao acetato, como ocorreu nas reações anteriores. Com uma presença de 97,30% (figura 20) e 98,30% (figura 21) respectivamente, do álcool citronelol.

Figura 20: Cromatograma da reação do complexo enzimático imobilizado em alginato de cálcio, com agente acilante acetato de vanila.

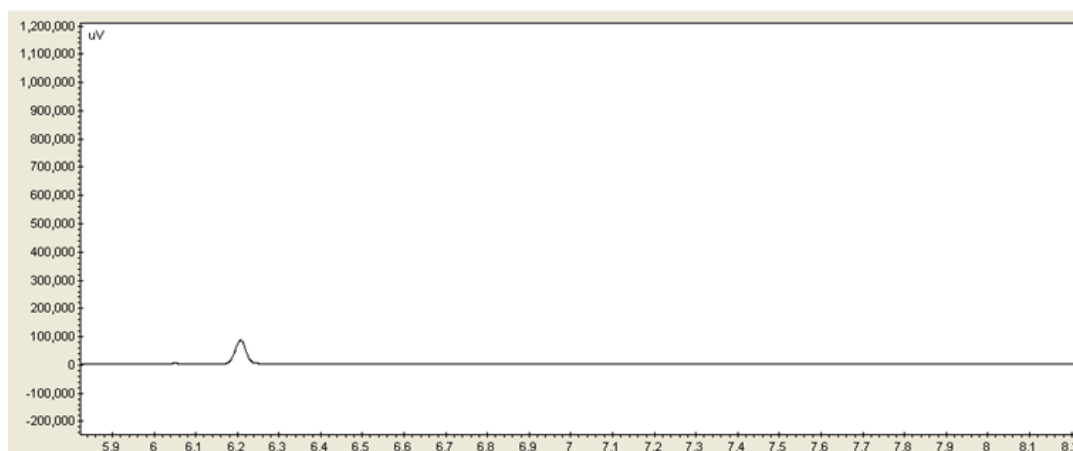
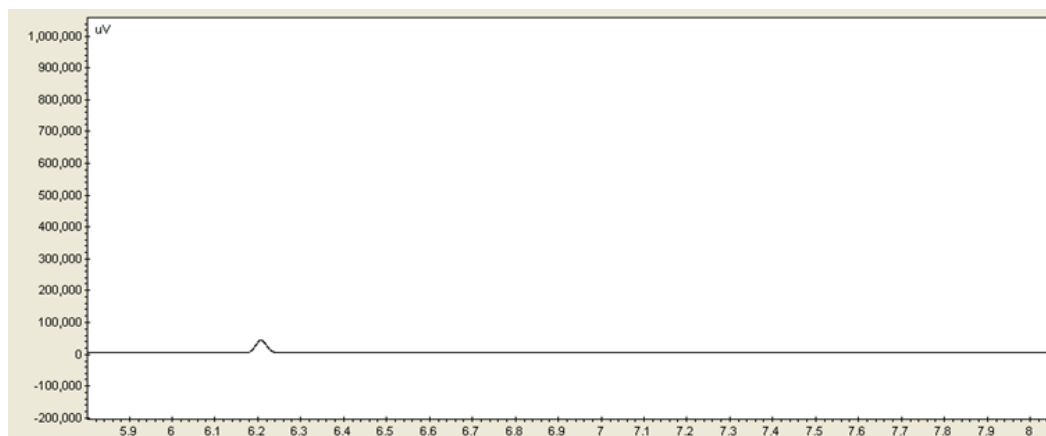


Figura 21: Cromatograma da reação do complexo enzimático imobilizado em óxido de titânio.



CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Manohot dulcis* (macaxeira), presente na da região do oeste da Bahia, no município de Barreiras, onde a solução aquosa “manipueira” proveniente da espécie foi material de estudo como um biocatalisador para a realização de reações enzimáticas de acetilação do álcool primário, sendo este o citrônolol. Os resultados obtidos apresentaram a eficiência do potencial biocatalítico para as reações, com uma conversão variando entre 75 a 99%. O sistema enzimático da *Manihot dulcis* imobilizadas em óxido de titânio se apresentou menos eficientes, quando comparadas com o complexo enzimático que foi imobilizado em alginato, mas ainda pode-se considerar um resultado significativo, quando observamos o rendimento da reação.

Para a mudança de agente acilante, do anidrido acético, que possui um caráter forte, para um agente acilante mais fraco, sendo o acetato de vanila, não ocorreu a reação de acetilação. Deve-se ao fato do potencial de conversão do agente acilante perante este tipo de reação.

A metodologia adotada apresentou eficiência para este tipo de imobilização, através de um confinamento em polímeros de alginato sendo competente na obtenção de esferas com o complexo enzimático da manipueira. O mesmo para a metodologia utilizada com o suporte se óxido de titânio, onde o complexo enzimático foi aprisionado com eficiência ao óxido de titânio.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELLOS, T. Resolução cinética enzimática de alcoóis e amins quirais contendo boro e bioedução de cetonas. Universidade de São Paulo. São Paulo 2011.

Bressel B. A. T. Sistema gerador de microcápsulas de alginato. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2007.

CARRERA, G.; Riva, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie International edition*, v. 39 p. 2226-2254, 2000.

CARVALHO, J. L. Biodiversidade e biotecnologia em mandioca. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. Brasília,DF. 2005.

CRUZ Jr., Américo; Pacheco, Sabrina Moro Villela; Furigo Jr, Agenor; Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Esferas de Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação de Óleo de Mamona. *Química Nova*, vol. 31, 2008.

DALLA, R.; Nascimento, G. M. Aplicação sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, Vol. 27, 623-630, 2004.

DIREI, D. Kieling; Aspectos gerais das enzimas; Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de engenharia química, Florianópolis, julho de 2002.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry, 4th Ed; Springer – Verlag, New York; 1999.

GOMES M. F.; Paula V. A.; Silva S. G.; Castro F. H. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. *Química Nova*, vol. 28, 2006.

GROPPO D. V.; Spoto, F. H. M.; Gallo, R. C.; Sarmiento, S. B. S. Effect of calcium chloride and film of sodium alginate in the conservation of minimally processed 'Pera' orange. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, 29(1): 107-113, jan.-mar. 2009.

JESUS, C. P.; João, J. J. Burlin, G.; Organogels: a new system for lipases immobilization and its application in organic synthesis. *Química Nova* vol.20, pg. 1997.

JOHNSON Andrew K.; Anna M. Zawadzka; Lee A. Deobald; Ronald L. Crawford; Andrzej J. Paszczynski Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *Journal Nanopart Res* v. 10; p. 1009–1025, 2008.

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

LENARDÃO, J. E.; Freitag, A. R.; Dabdou, J. M. Green chemistry: the 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities *Química Nova*; v. 26, p. 123-129, 2003.

MACHADO, L. L.; Lemos, T. L. G.; Mattos, M. C.; de Oliveira M. C. F.; Gonzalo.; Gotor-Fernandes, V.; Gotor. S.V. *Immobilized Manihot esculenta preparation as a novel biocatalyst in the enantioselective acetylation of racemic alcohols*. Tetrahedron: Asymmetry, v. 19, p. 1418-1423, 2008.

MACHADO L. L. Processos biocatalíticos usando células íntegras e imobilizadas de *Manihot esculenta* e *Manihot dulcis*. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza - 2008.

MANSKE C.; Ferreira B. J.; Wendhausen J. R.; Jesus C. P.; Transesterificação do acetato de vinila com alcoóis secundários catalisada por lípases imobilizadas em crisotila e no bagaço de cana. Departamento de Química-Universidade Regional de Blumenau. 31º SBQ, 2008.

MONDAL, K.; Mehta, P.; Mehta, B. R.; Varandani, D.; Gupta, M. N. A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, v. 1764, p. 1080-1086, 2006.

MONTANARI, A. C.; Bolzani S. V. Planejamento reacional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química. Nova*, v. 24, p.105-111, 2001.

MOTTA T. V. Bioquímica básica, Capítulo 3, Enzimas; Autolab; Pg 68-101.

NANDA, S.; Scott, A. I. A highly efficient chemoselective synthesis of #,5-diketoesters by lipase-catalyzed transesterification: application to the resolution of secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v. 30, p 1-12, 2004.

SALIS, A.; Pinna, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 54, p. 19-26, 2008.

SANTOS et al.; Avaliação da atividade de lípases imobilizadas em gel de pectina. *Química. Nova*. V. 17, 1997.

SEBRAE, estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula), janeiro de 2008.

SILVA, B. L. R.; Souza, R. R.; Santana, C. C.; Tambourgi, B. E. *Gel immobilization of enzymes from malted corn. Ciência. Tecnologia Alimentos*, v. 28(3): 642-648, 2008.

SUAVE, J.; Dallagnol, E. C.; Pezzin, A. P. T.; Silva, D. A. K.; Meier, M. M.; Soldi, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, v. 7, 2006.

SOUZA P. C.; Polo S. A.; Alves A. Imobilização de glicose oxidase em filmes nanocristalinos e mesoporosos de TiO₂ utilizando nanopartículas de Au Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, SP.

UBERTI COSTA E. V.;m Amorim N. L. H.; O emprego de lípases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica; aspectos gerais sobre a influencia do solvente. *UFRS. Química. Nova* v.22, 1999.

VALTER Motta; Bioquímica básica, capítulo 3 enzimas, Autolab análises clínicas. 2011.

WALTER Carvalho; Canilha, L.; Silva, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

ZHU YIHUA; Cao H.; Tang L.; Yang X.; Li C. Immobilization of horseradish peroxidase in three-dimensional macroporous TiO₂ matrices for biosensor applications. *Electrochimica Acta* v.54, p. 2823–2827, 2009.