

APLICAÇÕES DE ENZIMAS NA SÍNTESE E NA MODIFICAÇÃO DE POLÍMEROS

Marcos de Campos Cavalcanti de Albuquerque^a, Claudia Maria Soares Ribeiro^a, Carlos René Klotz Rabelo^a, Bernardo Galvão Siqueira^a, Ana Beatriz Abreu Santa Marinha^b e Aline Machado de Castro^{a,*}

^aPETROBRAS, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento, Av. Horácio Macedo, 950, 21941-598 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

^bPETROBRAS, Abastecimento e Petroquímica, Gerência de Tecnologia Petroquímica, Av. República do Chile, 65, 20031-912 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 07/06/2013; aceito em 10/12/2013; publicado na web em 21/03/2014

APPLICATIONS OF ENZYMES IN SYNTHESIS AND MODIFICATION OF POLYMERS. Enzymes are biological catalysts that offer great potential for use in the synthesis and modification of polymers, being more specific and greener than chemical catalysts. In this work, enzymes from the classes of hydrolases (lipase, cutinase and protease) and of oxidoreductases (horseradish peroxidase, manganese peroxidase and laccase) were identified as the main biocatalysts responsible for the synthesis of polymers. Biocatalysis can potentially be part of the life cycle of several polymers, including polyesters, polyurethanes, polycarbonates, polyamides, functionalized polysaccharides and polystyrene, allowing the synthesis of specialty macromolecules for fine applications and with higher added-value than commodity polymers.

Keywords: enzyme polymerization; biocatalysis; lipase.

INTRODUÇÃO

Processos de polimerização representam uma das principais transformações químicas industriais da atualidade, sendo, em sua maioria, conduzidos na presença de catalisadores químicos não renováveis e sob elevadas temperaturas, demandando, em alguns casos, a proteção e desproteção de grupos funcionais, de forma a evitar a ocorrência de reações indesejadas.¹

Há cerca de 20 anos, a catálise enzimática tem sido apontada como uma estratégia de grande potencial para a síntese de polímeros, por ser ambientalmente amigável e em geral bastante seletiva, permitindo assim a obtenção de macromoléculas com propriedades diferenciadas e de maior valor agregado.² As enzimas para a síntese e também modificação de polímeros estão nas classes das hidrolases (como lipases, proteases e esterases) e das oxidoreduções.³

A biocatálise pode ser empregada tanto para a síntese de polímeros naturais como de polímeros sintéticos, e dentre suas maiores vantagens está a elevada seletividade (enantio-, quimio-, estereo- e régio-seletividade), levando à obtenção de polímeros perfeitamente estruturados na maioria dos casos. Além disso, a catálise enzimática ocorre em geral de forma bastante eficiente sob condições mais brandas de temperatura e pressão,⁴ demanda reduzida (ou nenhuma) quantidade de solventes orgânicos,⁵ não proporciona a formação de produtos secundários e os produtos finais são de fácil separação e recuperação.⁶⁻⁸ Tais vantagens ficam claras especialmente quando são empregados biocatalisadores na forma imobilizada, a qual é uma técnica amplamente reportada pela literatura.^{9,10} A biocatálise foi reconhecida na década de 1990 como uma área nova na síntese de polímeros de precisão.¹¹

Dessa forma, o objetivo desse artigo é apresentar um panorama das principais enzimas e condições de processo que podem ser utilizadas para a síntese e a modificação de polímeros de interesse industrial. O reconhecimento da importância do tema se traduz pela existência hoje de livros inteiramente dedicados à polimerização enzimática.¹²⁻¹⁴

APLICAÇÕES DE ENZIMAS NA SÍNTESE DE POLÍMEROS

Poliésteres

Os poliésteres estão dentre os polímeros de maior importância industrial, apresentando-se ao mercado principalmente na forma de plásticos e fibras. A síntese química pode ocorrer sob condições variadas, dependendo da molécula a se produzir. No caso do poli(etileno tereftalato) (PET), um dos poliésteres mais conhecidos, a síntese química ocorre na presença de trióxido de antimônio a cerca de 280 °C.¹⁵

As reações de síntese de poliésteres podem ser classificadas em dois grandes grupos: reações de abertura de cadeia cíclica ou anel (ROP, do inglês *Ring Opening Polymerization*) e reações de policondensação. Estas últimas podem ser divididas em reações entre ácidos dicarboxílicos (ou seus derivados, como ésteres) e glicóis (especialmente dióis), e reações de autopolicondensação entre hidroxíácidos (ou seus ésteres).⁵

Apesar do elevado número de diácidos e dióis conhecidos permitirem a obtenção de uma gama muito ampla de polímeros com propriedades diferenciadas, as reações de policondensação geralmente são mais intensivas em energia e requerem condições de processo mais drásticas para direcionar as reações para altas taxas de conversão e síntese de polímeros com maior massa molar.¹⁶ A Tabela 1S apresenta alguns dos monômeros que podem ser utilizados na síntese de poliésteres por reações de policondensação. Cabe ressaltar que muitos destes monômeros podem ser produzidos via fermentação,¹⁷⁻¹⁹ tornando ainda mais sustentável a produção e utilização de poliésteres, pelo fato de serem obtidos a partir de fontes renováveis.

As enzimas mais empregadas para a síntese de poliésteres são as esterases (EC 3.1.1.X), mais especificamente as lipases (EC 3.1.1.3), carboxilesterases (EC 3.1.1.1), cutinases (EC 3.1.1.74) e polihidroxialcanoato depolimerases de cadeias curta (EC 3.1.1.75) e longa (EC 3.1.1.76), pois são elas as responsáveis por catalisar a formação da ligação éster entre álcoois e ácidos orgânicos em sistemas com baixa concentração de água.^{20,21}

As lipases e esterases apresentam funções no metabolismo de muitos seres vivos, como micro-organismos, animais superiores e

*e-mail: alinebio@petrobras.com.br

antarctica imobilizada em uma resina macroporosa. Esta enzima apresenta altas taxas de reação e boa estabilidade térmica quando comparada com lipases de outras origens. Todos os processos citados na Tabela 2S utilizaram enzimas imobilizadas em resina acrílica, sendo que em alguns as enzimas foram recicladas, enquanto que outros autores as utilizaram apenas uma vez.

Como exemplo da vantagem do uso de biocatalisadores, Yang *et al.*³³ fizeram uma comparação entre o uso de óxido de di-butil-estanho (DBTO) e a enzima comercial Novozym 435 como catalisadores para a síntese de poli(diácido oléico-co-glicerol). Enquanto a reação com o catalisador químico se desenvolveu a 150 °C, a reação utilizando a enzima se desenvolveu bem a 70 °C. A reação com o DBTO gerou polímeros com massa molar média de 1750 g/mol em 6 horas de reação. Já a reação enzimática gerou polímeros com massa molar média de 6000 g/mol para o mesmo tempo de reação. A reação catalisada pela enzima também evitou a formação de gel e ligações cruzadas, diferentemente da reação com o catalisador químico, devido principalmente às maiores seletividade e especificidade do biocatalisador. Essas características, identificadas na reação catalisada pela enzima, permitem a obtenção de um produto de maior valor agregado que pode ser utilizado para a confecção de fibras e filmes, dentre outros produtos.³³

Síntese via reações de abertura de anel

A polimerização por abertura de anel (ROP) é a estratégia utilizada para a síntese de poliésteres a partir de lactonas, lactídeos, carbonatos, fosfatos e tioésteres cíclicos.^{34,35} Esse mecanismo permite um bom controle da distribuição da massa molar e é particularmente bem adequado para a engenharia macromolecular da produção de homo- e copolímeros de várias arquiteturas. Em comparação à policondensação, a ROP demanda menores temperaturas e tempos de reação, além de apresentar um comportamento mais estável da estequiometria do processo ao longo da reação. Esta rota também não requer que a água seja constantemente retirada do meio, fato este que dificulta a remoção do solvente, no caso da rota de policondensação.³⁶

Os catalisadores organometálicos utilizados nas reações de ROP de lactonas e lactídeos são baseados em derivados de metais como Zn, Al, Sn e Ge, que podem ser tóxicos quando em altas concentrações.³⁷ O uso de enzimas elimina a necessidade de adição destes metais, além de permitir que se logrem também condições mais ambientalmente amigáveis de reação, conforme discutido anteriormente. A biocatálise também independe da exclusão de água e ar do meio reacional, o que não acontece no caso dos catalisadores químicos, devido à maior dependência do equilíbrio de reação.³⁸ As lipases apresentam-se como enzimas especiais nesse caso, pois possuem uma atuação sobre uma grande gama de substratos, podendo reagir com lactonas (anéis pequenos ou grandes), diésteres cíclicos (lactídeos) e carbonatos cíclicos, gerando assim poliésteres e policarbonatos alifáticos.

As lipases também são capazes de reagir com lactonas com anéis com mais de 6 carbonos, gerando polímeros de maior massa molar e com taxa de reação maior que os catalisadores organometálicos correspondentes.³⁹ O *hot-spot* nesse campo tem sido a busca por lipases capazes de catalisar a síntese conjunta, *one-pot* (em um mesmo sistema reacional), de co-polímeros, os quais são de interesse particular para diversas indústrias, por possuírem dois ou mais monômeros combinados para formar um polímero com propriedades intermediárias aos polímeros correspondentes aos seus monômeros isolados.⁴⁰

A catálise enzimática por ROP ocorre normalmente em solventes orgânicos como tolueno, heptano, 1,4-dioxano e diisopropil éter, dentre outros.²³ Porém, com as atuais buscas por processos mais sustentáveis, o uso de solventes de baixo impacto ambiental e menor risco à segurança ocupacional tem sido priorizado. Dentro deste contexto,

já foram reportadas sínteses bem sucedidas utilizando lipases em meio com dióxido de carbono supercrítico,⁴¹ líquidos iônicos⁴² e água, seja o polímero suspenso em meio aquoso⁴³ ou presente em micro emulsões.⁴⁴

Cabe ressaltar que, diferentemente de outras esterases, tais como as lipases, que catalisam tanto reações de policondensação como ROP, as PHA depolimerases catalisam apenas reações de polimerização por ROP na ausência de água, como descrito por Santos *et al.*²¹

Policaprolactonas e polilactatos

Dentre os poliésteres sintetizados por ROP, cabe ressaltar a importância das policaprolactonas (PCL) e dos polilactatos (PLA). As propriedades físicas, térmicas e mecânicas das PCL dependem de sua massa molar e do seu grau de cristalinidade. Elas possuem uma propriedade rara, de serem miscíveis em vários outros polímeros, tais como: poli(cloreto de vinila), poli(estireno-acrilonitrila), poli(acrilonitrila-butadieno-estireno), poli(bisfenil-A), policarbonatos, nitrocelulose e celulose-butirato. As PCL também possuem a propriedade de serem mecanicamente compatíveis com outros polímeros, tais como: polietileno, polipropileno, borracha natural, poli(acetato de vinila), e borracha poli(etileno-propileno).⁴⁵ Um de seus maiores atrativos para uso industrial advém do fato de serem polímeros biodegradáveis.⁴⁶ Durante a ROP de lactonas não há formação de água ou álcool, diferentemente do observado em reações de policondensação (a depender se um ácido dicarboxílico ou seu diéster é usado como monômero). As enzimas são capazes de catalisar a ROP de lactonas com anéis de tamanhos pequenos (4 a 6 carbonos cíclicos) a grandes (12 ou mais carbonos cíclicos) e, normalmente, reações em meios orgânicos apolares são as que apresentam maiores rendimentos.⁴⁷

O PLA é um exemplo de biopolímero que, atualmente, é sintetizado quimicamente por reação de ROP (nesse caso de um diéster cíclico de ácido láctico - lactídeo). Dentre suas principais vantagens para uso industrial estão o fato de ter seus monômeros (isômeros D e L do ácido láctico, geralmente produzidos em separado, com elevada especificidade) produzidos via fermentação microbiana, de apresentar boa biocompatibilidade e elevada biodegradabilidade.⁴⁸ Introduzindo algumas variações na massa molar e na cristalinidade, bem como pela seleção dos monômeros para a síntese (isômeros puros ou sua mistura, em diferentes proporções), é possível obter o polímero nas formas isotática, heterotática e sindiotática,⁴⁹ e o PLA formado pode se tornar um material de alto valor agregado, sendo utilizado nas áreas biomédica e alimentícia, dentre outros usos gerais.⁴⁸ Entretanto, a síntese química do PLA requer catalisadores metálicos (como alcóxido de alumínio e diiminato de zinco)⁴⁹ que representam um elevado passivo ambiental (devido a sua síntese e disposição final), e que levam à formação de subprodutos e resíduos químicos que necessitam de cuidados relativos à saúde e segurança. A mudança da rota química para uma rota biotecnológica é interessante como forma de superar esses problemas.²⁷

O ácido láctico, via de regra, não é diretamente polimerizado a PLA, porque a cada formação de ligação éster durante a reação de polimerização, uma molécula de água é liberada, e esta consequentemente hidrolisa a ligação recém-formada, levando à obtenção de polímeros de baixa massa molar. Dessa forma, o ácido láctico é primeiramente oligomerizado e dimerizado cataliticamente a lactídeos cíclicos. Apesar da dimerização também gerar moléculas de água, estas podem ser separadas antes da etapa de polimerização. O PLA de alta massa molar é produzido a partir de monômeros lactídeos por ROP utilizando um catalisador que pode ser químico ou enzimático.⁵⁰ Esse mecanismo não gera moléculas adicionais de água, o que permite a formação de polímeros de maior massa molar. Monômeros com

maior presença de um isômero ótico permitem gerar um PLA com maior cristalinidade que um PLA obtido a partir de misturas racêmicas de monômeros, o que torna o uso de enzimas mais atrativo para aplicações comerciais devido a sua estereosseletividade.⁵¹

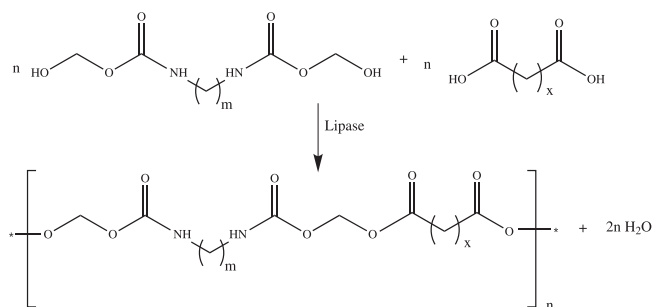
Poliuretanos

A rota química tradicional de síntese de poliuretanos é a partir de glicóis e diisocianatos (aromáticos ou alifáticos), que em geral são compostos tóxicos produzidos a partir do fosgênio, um composto ainda mais tóxico.¹⁵ Dessa forma, o poliuretano sintetizado se torna resistente à biodegradação.⁵² Para a nova geração de poliuretanos, as buscas se concentram em processos de síntese que não utilizem diisocianatos e fosgênios, e também que possam utilizar matérias-primas renováveis. Isso não garante que o produto final será mais biodegradável, mas garante que o processo de síntese do poliuretano se torne mais sustentável. A rota enzimática pode atender a ambas as necessidades, porém até um levantamento realizado em 2006 não havia ainda um processo industrial estabelecido para a síntese enzimática de poliuretano.⁵³

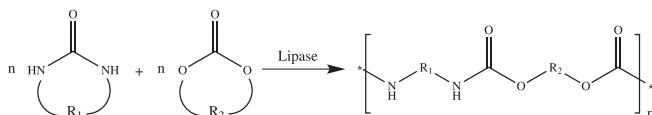
Existem duas rotas principais para a síntese de poliuretano sem a utilização de diisocianato e fosgênio. A rota mais comum se baseia na utilização de carbonatos cíclicos e aminas. Essa rota, por sua vez, pode se desdobrar em duas vias: A primeira via consiste na formação de uretanodióis pela reação de dióis equivalentes a um carbonato cíclico e uma amina, seguida de uma policondensação dos dióis com diácidos apropriados;⁵⁴ a segunda via consiste na poliadição de carbonatos cíclicos e aminas bifuncionais.⁵⁵ A outra rota consiste na polimerização por abertura de anel de uretano cíclico.⁵⁶

Na Figura 2 estão representadas as estruturas gerais da síntese de poliuretanos pela via enzimática sem a utilização de diisocianatos. A síntese de poliuretanos catalisada por lipases, principais enzimas responsáveis por essa síntese, ocorre pela poliesterificação entre dióis de baixa massa molar contendo grupos funcionais uretanos (uretanodióis) e vários diácidos ou diésteres. Essa rota pode eliminar a necessidade do uso de diisocianatos.⁵⁷

1. Policondensação entre diácidos e dióis



2. Poliadição de carbonatos cíclicos e diaminas



3. ROP de uretanos cíclicos

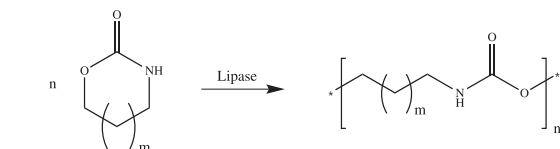


Figura 2. Reações de síntese de poliuretanos via enzimática

As lipases atuam em ambas as rotas, e além das vantagens citadas na introdução deste artigo, cabe ressaltar que elas são capazes de catalisar reações reversíveis à polimerização, que neste caso é a hidrólise, abrindo assim a oportunidade para uma posterior degradação (para fins de reuso) destes polímeros. Cadeias poliméricas contendo grupos funcionais hidrolisáveis podem ser clivadas enzimaticamente para produzir fragmentos de baixa massa molar que podem vir a ser repolimerizados.^{58,59}

Um poli(éster-uretano) (PEU) foi preparado pela ROP de oligômeros cíclicos de éster-uretano, que foram preparados pela biodegradação de diuretanodiol (DUD) e diéster ácido dicarboxílico utilizando uma lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) e pela policondensação direta de DUD e diéster ácido dicarboxílico. Uma massa molar maior de PEU foi obtida pela ROP de éster-uretano cíclico (101.000 g/mol) quando comparado à policondensação direta de diéster ácido dicarboxílico com DUD (31.000 g/mol), ambas catalisadas por esta lipase, em condições de reação de 110 °C.⁶⁰ Apesar do interesse por esse tipo de reação, cabe ressaltar que ligações éster são suscetíveis à hidrólise em meio alcalino, reduzindo, assim, a resistência do polímero. Ligações do tipo carbonato podem ser introduzidas em substituição às ligações éster, sendo assim mais resistentes à hidrólise em meio alcalino. Nesse caso, então, ao invés de se utilizar diésteres como monômeros, deve-se optar por utilizar dietil carbonatos, sendo a policondensação a rota de síntese preferencial das lipases.⁶¹

Já no trabalho de Yanagishita *et al.*,⁵⁹ a síntese de poli(diéster uretanos) foi comparada pelas rotas de ROP e polimerização direta, a 120 °C e 110 °C, respectivamente. A maior massa molar (86.000 g/mol) foi observada após 3 dias de reação na presença de uma lipase de *Candida antarctica* e de anisol, com um rendimento de 74%.

As lipases apresentam vantagens também em processos de regeneração de poliuretanos, pois a catálise química geralmente leva à liberação de dióxido de carbono, que é regenerado com o uso de diisocianato. As enzimas permitem que as ligações éster e carbonato sejam clivadas, formando oligômeros cíclicos, sem que haja a liberação desse gás.⁶²

Cabe comentar que, no âmbito da Química Verde, a síntese de poliuretanos pode ocorrer utilizando oligômeros de polióis provenientes de biomassa, também catalisada por enzimas. Como um exemplo nessa área, as seguintes patentes são relacionadas a processos para produção de polímeros, principalmente poliuretanos, baseados em polióis originários do óleo de soja: U.S. Patents 6.399.698, 6.686.435, 6.624.244, 6.573.354, 6.548.609, 6.476.244, 6.465.569, 6.433.121, 6.107.433, 5.932.336, 5.674.802, 5.482.980, 4.220.569 e 4.025.477. Entretanto, nenhuma dessas patentes envolve o uso de enzimas.

Como um exemplo de aplicação da catálise enzimática a partir de tais monômeros renováveis, Kiatsimkul⁶³ verificou a possibilidade de obter polióis com seletividade e rendimentos que não poderiam ser atingidos pela síntese química. O autor verificou que a polimerização pode ser iniciada tanto pela ligação de grupos hidrogenoperóxidos aos ácidos graxos da soja, utilizando uma lipoxigenase (EC 1.13.11.12), quanto pela epoxidação ou hidrólise de lipídeos da soja utilizando a lipase comercial Novozym 435. Essas rotas levaram à formação de reagentes ativos para iniciar a polimerização do poliuretano.⁶³

Poliâmidas e polipeptídeos

Poliâmidas (PAs) são mais conhecidas por conta da popularidade do nylon, seu polímero derivado mais popular. Os processos industriais atuais para a produção de nylon são complexos, pois uma vez que ocorrem sob altas temperaturas, a degradação térmica pode levar à: ciclização, alteração no balanço de grupos funcionais reativos, formação de ramificações, e eventual gelificação. Essas alterações químicas interferem na qualidade do produto final em termos de

processamento, propriedades físicas e presença de subprodutos indesejáveis no polímero.⁶⁴

Uma das maiores vantagens do uso de enzimas na síntese de poliamidas é reduzir a temperatura do processo de síntese do *nylon*, e eventualmente prevenir as reações indesejadas provenientes da degradação térmica. A reação química normalmente é feita pela poli-condensação de dimetil adipato e EDTA a 180 °C gerando polímeros com massas molares médias de 9.000 g/mol. Com o uso de enzimas, as temperaturas ficam entre 50-150 °C.⁶⁵

Antes do ano 2000, a abordagem da literatura para a síntese enzimática de poliamidas e polipeptídeos (polímeros formados a partir de aminoácidos, ou seja, moléculas compostas por inúmeras ligações amida, e que geralmente encontram-se reportados na literatura associadamente às poliamidas) focava na obtenção de oligômeros (grau de polimerização entre 2-8), porém a partir desse ano tem sido possível observar relatos de síntese de polímeros com mais alta massa molar.⁶⁶

Existem três (sendo duas principais) abordagens para a síntese enzimática de poliamidas e de polipeptídeos. A primeira abordagem envolve o uso de enzimas proteolíticas (proteases, EC 3.4.x.x) e a segunda compreende o uso de lipases ou esterases. Tanto proteases como lipases utilizadas tendem a possuir uma especificidade mais abrangente e podem ser aplicadas na síntese de diferentes tipos de poliamidas e polipeptídeos. A terceira abordagem envolve o uso de enzimas que não sejam esterases ou proteases, e será exemplificada mais a seguir nesta seção.⁶⁶

As proteases são classificadas em 6 grupos, com base em seus sítios ativos (note-se que existem outras formas de classificação de proteases, como a que se baseia em sua forma de atuação sobre o substrato – endopeptidases, exopeptidases, etc): serina proteases (como a tripsina, quimiotripsina e subtilisina),⁶⁷ treonina proteases,⁶⁸ cisteína proteases (como a papaina e a bromelina),⁶⁹ aspartato protease (como a pepsina),⁷⁰ glutamato protease⁷¹ e metaloprotease (como a termolisina).⁷² A síntese de polipeptídeos catalisada por proteases pode ocorrer regida por um controle termodinâmico ou cinético.⁷³ No caso do controle termodinâmico (aplicável a todos os grupos de proteases), a síntese está em equilíbrio com a hidrólise (reação reversa). As desvantagens dessa abordagem são as baixas taxas de reação e rendimentos nos produtos, quantidade grande de enzima necessária, e as condições de reação que devem ser utilizadas de forma a se deslocar a reação em direção à síntese. Já o controle cinético aplica-se a apenas a reações catalisadas por serina, cisteína e treonina proteases. Nesse caso, a água e grupos amina competem pela reação com os complexos acil-enzima. O sucesso da ocorrência de síntese depende das taxas cinéticas relativas dessas reações. A especificidade, concentração de substrato, modo de ativação do grupo carboxílico, temperatura, pH, e meio de reação podem impactar no rendimento do produto e na massa molar.⁷⁴

Apesar das propriedades catalíticas vantajosas, proteases não são necessariamente os catalisadores ideais para a síntese peptídica. A hidrólise é sempre um agravante, que impede a síntese de polímeros com alta massa molar. Devido a este fato, muitas estratégias tem sido desenhadas para otimização destas reações, como por exemplo o desenvolvimento de proteases com propriedades melhoradas (a partir do uso de técnicas de engenharia de proteínas), a modificação dos substratos, o uso de enzimas imobilizadas ou com ligações cruzadas, a utilização de solventes orgânicos, líquidos iônicos e sistemas criogênicos.⁷⁵

Além de seu grande potencial para a síntese de poliésteres, lipases também são conhecidas por catalisarem a formação de poliamidas. A lipase de pâncreas suíno (PPL) é apontada por muitos autores como a mais eficiente para esta síntese.⁷⁶ Em uma patente depositada em 2000, Cheng *et al.*⁷⁷ utilizaram lipases comerciais para sintetizar poliamidas a partir de diésteres (ou diácidos) e diaminas com a estrutura geral apresentada na Figura 3.

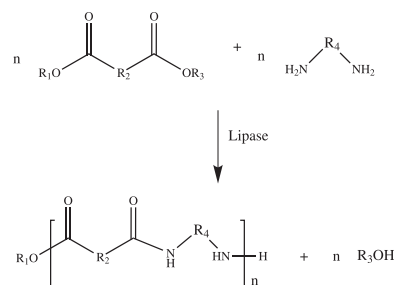


Figura 3. Reação geral da síntese de poliamidas catalisada por lipases. R1 e R3 podem ser metil, etil, H, ou outros grupos de saída convenientes; R2 e R4 são grupos alquil que podem conter dupla ligações olefínicas ou heteroátomos que podem ser O, CH2, NH ou S; e 'n' é o número de unidades de repetição

Gu *et al.*⁷⁸ realizaram ensaios que demonstraram que as reações catalisadas por lipases geram polímeros com massas molares maiores que nas reações catalisadas por proteases. Os autores utilizaram enzimas das seguintes fontes: *Pseudomonas fluorescens*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas sp.*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger* e *Mucor miehei*. As maiores atividades foram encontradas nas enzimas comerciais de *Candida antarctica* (Novozym 435) e *Mucor miehei* (Amano Lipase M) imobilizadas, em reações de polimerização em massa tendo como monômeros dimetilésteres de ácidos (fenil)malônico/fumárico/adípico e sistemas com diaminas dietilenotriamina/trietileno-glicol. Os autores também observaram que as reações enzimáticas induziram menos a formação de ramificações que as reações catalisadas quimicamente. As propriedades dos polímeros sintetizados via rota química e enzimática foram similares. Sabe-se pela literatura que o uso de lipases permite que sejam sintetizadas algumas poliamidas que não são facilmente obtidas via processos químicos (por exemplo poliamidas derivadas de dialquil malonatos, dialquil fumaratos e dialquil maleatos).⁷⁹

A síntese de polieteramidas também foi catalisada por lipases a partir de amino-etilésteres ou dietiléteres e diaminas, na presença do solvente difenil éter e na ausência de água, em sistema reacional sob baixa pressão, para facilitar a remoção do etanol gerado ao longo da reação. Os rendimentos finais foram de 70-80% quando a enzima Novozym 435 foi utilizada.⁸⁰ Poliesteramidas também podem ser sintetizadas via rota enzimática utilizando lipases, permitindo assim a obtenção de polímeros com elevada biodegradabilidade.⁸¹

Na terceira abordagem estão as enzimas normalmente provenientes de extratos celulares, que catalisam a síntese de poliamidas e polipeptídeos. Existem poucos trabalhos com essa abordagem, e menos ainda aqueles que utilizam enzimas isoladas para esse fim.⁸² Entre algumas enzimas já descritas na literatura, que podem atuar na catálise de poliamidas, pode-se citar: dipeptidil transferase (EC 3.4.14.1)⁸³ cianoficina sintase (EC 6.3.2.29-30)⁸⁴ e folipoli- α -glutamato sintase (EC 1.4.1.13-14).⁸⁵ Entretanto, essas reações geralmente apresentam baixo rendimento, além do fato de esses biocatalisadores apresentarem baixa estabilidade na temperatura e pH da reação, necessitarem de ATP e, ainda algumas vezes, necessitarem da presença de cofatores para sua atuação. Alguns autores citam o uso de peroxidases, lacase e bilirrubina oxidase na polimerização de tirosina, porém nesse caso os polímeros não possuem a estrutura α -peptídica, mas sim são formados por polifenóis (que serão abordados na seção a seguir).⁸⁶

O processo adotado para a síntese do polímero também pode influenciar suas propriedades. Ragupathy *et al.*⁸⁷ fizeram uma comparação entre diferentes processos para a síntese de poliamida utilizando a enzima Novozym 435 como catalisador. Os diferentes processos e condições estão na Tabela 1. Os autores utilizaram tolueno e difenil éter desidratados como solventes, e observaram que reações multietapas, com gradiente crescente de temperatura, proporcionaram

Tabela 1. Influência de múltiplas etapas na síntese de poliamidas (Elaborado a partir de Ragupathy *et al.*)⁸⁷

Monômero	Número de etapas do processo	Condição	Rendimento	MM (g/mol)
DES/DAO	Uma	60-150 °C e baixa pressão	65%	520-2000
DES/DAO	Duas	60-130 °C e baixa pressão	66%	2000-6000
DES/DAO	Três	60-150 °C, baixa pressão e o dobro de enzima	97%	2120-5380
ETD/DAH/DAO/DADD	Três	60-140 °C	85-90%	5560-8250

DADD, 1,12-diaminododecano; DAH, 1,6-diaminohexano; DAO, 1,8-diaminooctano; DES, dietil-sebacato; ETD, etileno tridecanodiato, MM: massa molar.

a síntese de polímeros com maior massa molar, chegando a obter um nylon-12,13 de 8000 g/mol.

Polifenóis e polimerização via radicais livres

As duas classes de enzimas dominantes no campo da biocatálise para polimerização radicalar são as oxidoredutases, principalmente peroxidases (EC 1.11.1.x) e lacases (EC 1.10.3.2). Apesar de possuírem mecanismos catalíticos diferentes e distintos aminoácidos no sítio ativo, ambos os grupos de enzimas catalisam predominantemente reações de abstração de hidrogênio do substrato, gerando espécies radicalares que iniciam a reação de polimerização. Outras enzimas como oxidases (EC classe 1) e lipoxigenases (EC 1.13.11.x) exercem um papel menor nessas reações.⁸⁸

As peroxidases, especialmente as proteínas do grupo Heme como a peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, EC 1.11.1.7), têm sido umas das mais estudadas como catalisadoras da polimerização via radicais livres de monômeros vinila e compostos aromáticos. Elas podem catalisar a transferência de um elétron de um peróxido de hidrogênio para um cossubstrato, criando radicais de forma efetiva e, assim, iniciando a polimerização.⁸⁹ Na Figura 4 é apresentada uma reação geral de formação de radicais de polivinila, catalisada por enzimas.

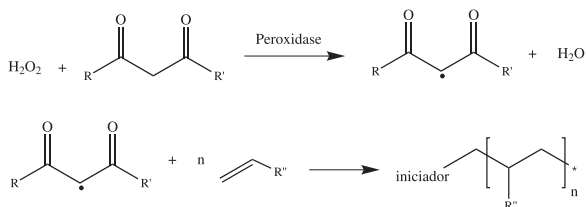


Figura 4. Reação geral da polimerização radicalar de polivinila onde o iniciador é ativado via catálise enzimática

No caso da síntese de polifenóis, as enzimas de maior importância são as oxidoredutases (como a lacase - EC 1.10.3.32) a peroxidase de raiz forte e a bilirrubina (EC 1.3.3.5). A peroxidase de raiz forte é uma das mais utilizadas, permitindo a polimerização a partir de derivados de fenol e de anilina e utilizando peróxido de hidrogênio como agente oxidante. Na Figura 5 está apresentada uma reação geral da formação de radicais que dão início à síntese de polifenóis.

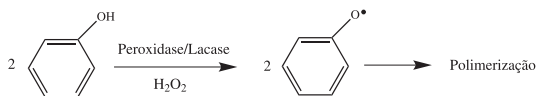


Figura 5. Reação geral da síntese de polifenóis catalisada por enzimas

O peróxido de hidrogênio desempenha um papel ambivalente durante o processo de polimerização. Por um lado, ele se comporta como agente oxidante, sendo essencial para a ação catalítica.⁹⁰ Por outro lado, se a concentração de H₂O₂ estiver muito alta, a reação pode ser inibida de duas formas: pela inativação do grupo funcional

Heme, levando à inativação irreversível da enzima; ou quando essa enzima demonstra uma atividade similar à da catalase (EC 1.11.1.6), levando à formação de O₂, e assim inibindo a formação do radical e impedindo o início da reação. No entanto, cabe salientar que esses mecanismos ainda precisam ser melhor elucidados. A polimerização só procederá se o O₂ formado for consumido, provavelmente, mediante reações com o substrato.⁹¹

A estratégia mais utilizada para evitar excesso de H₂O₂ no sistema reacional é a adição dessa espécie de forma fracionada. Outras abordagens já foram sugeridas, como a adição de glicose oxidase e glicose no meio, que levaria à formação *in situ* de H₂O₂, porém nenhuma das outras técnicas foi aplicada industrialmente.⁹²

Apesar de serem muito utilizadas industrialmente, peroxidases de raiz forte possuem enzimas análogas de outras fontes, como a peroxidase obtida de um fungo da podridão branca (*Phanerochaete chrysosporium*), que pode apresentar atividade semelhante à peroxidase de origem vegetal, porém com menor custo de produção.⁹³

As lacases, também conhecidas como oxidases de cobre azul, são responsáveis por catalisar a abstração de hidrogênio de compostos fenólicos. São produzidas, na maior parte, por fontes microbianas e vegetais.⁹⁴ Essas enzimas possuem um grupo prostético com 4 átomos de cobre responsáveis pelas reações redox, que levam a reações relativamente estáveis termodinamicamente e que permitem a regeneração da enzima ao seu estado reduzido inicial após a catálise.⁹⁵ Apesar do processo catalítico mediado pela lacase ser relativamente mais simples que aqueles em que peroxidases são usadas, na literatura se encontram mais estudos a respeito do uso destas últimas enzimas. Uma vantagem aparente da lacase é que ela utiliza oxigênio molecular ao invés do peróxido de hidrogênio como agente oxidante, porém a restrição do seu uso pode estar ligada a problemas de inibição.⁹⁶ A implementação industrial de processos de polimerização com essas enzimas provavelmente não irá ocorrer em curto prazo devido a limitações de custo, porém seu uso pode resultar em rotas ambientalmente amigáveis.⁸⁸

Cabe ressaltar que o uso de oxidoredutases pode ser útil na obtenção de polímeros para aplicações de alta tecnologia, que não envolvem apenas compostos biomédicos e quirais. Como exemplo, Nozoe *et al.*⁹⁷ estudaram o uso de peroxidase de raiz forte para a síntese de polifenol. A enzima permitiu a síntese de microesferas de polifenol com 300 nm, cujas aplicações incluem a adsorção eficiente de germânio (um metal raro) em colunas empacotadas com as microesferas, que podem então ser facilmente manipuladas.

A síntese enzimática de polianilinas por lacases e peroxidases também vem sendo muito estudada, e dentre suas utilizações pode-se citar: trocadores iônicos solúveis, materiais para armazenamento de energia, revestimento resistente à corrosão e catalisadores.⁹⁸ A síntese enzimática de polifenóis geralmente ocorre em meio aquoso e em condições brandas de temperatura e pH.⁹⁹

Poliestireno

A rota industrial preferencial para a síntese de poliestireno é via radicais livres, utilizando peróxidos, persulfatos ou compostos azo,

como a azonitrila, e ocorre via poliadição em massa, em solução, em emulsão ou em suspensão.¹⁵ No entanto, iniciadores azo não são muito eficientes e deixam compostos tóxicos no polímero produzido. Poliestirenos têm sido sintetizados com ácidos orgânicos sob temperaturas entre 140-150 °C, ou ainda a temperaturas mais baixas, como 25 °C, caso o pKa do ácido esteja na faixa de 0,5-2,5.¹⁰⁰

O uso de peroxidases pode eliminar a utilização de catalisadores baseados em substâncias tóxicas, conferindo assim vantagens do ponto de vista ambiental.¹⁰¹ Em um estudo comparativo, Kwon *et al.*¹⁰² verificaram que o uso de uma manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) gerou um poliestireno de maior polidispersão e com maior rendimento (2,61, 82,3%, respectivamente) quando comparado ao catalisador químico Mn(III) (1,75, 77,9%, respectivamente), e com rendimento maior que o observado com o uso da peroxidase de raiz forte (23,2%), quando empregada nas mesmas condições e concentrações. As peroxidases ainda permitem a síntese de complexos de poliestireno sulfonado (SPS) com polianilina,¹⁰³ e poliestireno-co-alquil metacrilato (que pode ser usado na obtenção do diesel com ultra baixo teor de enxofre).¹⁰⁴

Além das peroxidases, lipases podem ser utilizadas na síntese de polímeros com blocos de poliestireno alternados com policaprolactonas em reações químico-enzimáticas em cascata e *one-pot*. Neste caso, uma reação de ROP catalisada por lipase pode ser seguida de uma reação radicalar catalisada por catalisador químico (por exemplo bromo-cobre). A enzima permite condições de processo muito mais brandas do que quando na presença de catalisadores químicos como o óxido nítrico (90-120 °C), utilizado na mesma etapa em que ela se apresenta como alternativa.¹⁰⁵

Polissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas formadas por unidades de repetição entre um doador e um aceptor glicosídico. São majoritariamente encontrados em fontes renováveis, onde são sintetizados via catálise enzimática por ação de sintases, hidrolases e transferases, em geral.¹⁰⁶

Uma das áreas de pesquisa que tem sido apontada como tendência nos últimos anos é a síntese de substratos análogos a polissacarídeos, conhecidos como moléculas biomiméticas. Neste caso, as moléculas devem ser desenhadas de acordo com um conceito de “substrato análogo ao estado de transição” (do inglês *Transition State Analogue*), de modo que sua estrutura deve ser similar à estrutura de transição encontrada nas reações enzimáticas presentes *in vivo*.¹⁰⁷ Esse conceito foi baseado no fato de que glicosil fluoretos e oxazolinas de açúcares são reconhecidos de forma eficiente como substratos por hidrolases. Há relatos na literatura que alguns polissacarídeos análogos à celulose e xilana já foram sintetizados via catálise enzimática a partir de monômeros glicosil fluoretos.¹⁰⁷ Já a partir do uso de oxazolinas de açúcares como monômeros, tem-se conhecimento da síntese das macromoléculas quitina, hialuronana, condroitina e derivados de aminopolissacarídeos.¹⁰⁸

Esse comportamento de catálise multi-funcional, que tem sido identificado em diversos tipos de enzimas, está muito além do conceito de chave-fechadura, que foi assumido durante décadas como o representativo da catálise enzimática. Há alguns anos, um novo doador glicosídico foi reportado, sendo reconhecido por uma endoglucanase (EC 3.2.1.4), um tipo de celulase.¹⁰⁹ O composto é ativado por um grupo 4,6-dimetoxi-1,3,5,-triazina-2-il (DMT) ligado ao carbono anomérico dos monômeros de lactose – glicose e galactose.¹¹⁰

Outras reações mediadas por biocatálise *in vitro* também se encontram relatadas, como a síntese de amilose pela polimerização de monômeros de glicose-1-fosfato catalisada por uma fosforilase (EC 2.4.1.1). Essas reações permitem a agregação de cadeias glicosídicas

em outros polímeros, como poliésteres, nos quais o polissacarídeo assume uma ligação similar a uma vinha, ao redor do outro polímero, em uma reação conhecida como “*vine-twining polymerization*”. Esse exemplo apenas demonstra a ampla gama de reações de glicosilação que podem ser realizadas via catálise enzimática.¹¹¹

Como um exemplo dessa aplicação, Nakamura *et al.*¹¹² reportaram a obtenção de celulose *in vitro*, utilizando como monômero o fluoreto de -D-celobiosil na presença de um tampão acetato/acetonitrila, utilizando uma endoglucanase de *Trichoderma viride*, imobilizada em ouro, e conduzindo a reação em duas etapas (*two-steps*) a 30 °C. Esta foi uma proposta alternativa à síntese natural da celulose, que é viabilizada por um complexo de celulose sintases (EC 2.4.1.12).

Policarbonatos

Sendo um tipo particular de poliésteres, os policarbonatos alifáticos são materiais biodegradáveis¹¹³ com potencial importante para aplicação em aditivos termoplásticos¹¹⁴ e como material para matriz sólida de eletrólitos.¹¹⁵ Eles têm sido utilizados na indústria, principalmente, como blocos de construção de poliuretanos especiais.¹¹⁶ Estas macromoléculas podem, ainda, ser utilizadas no preparo de membranas feitas de poliimidas contendo segmentos de policarbonatos alifáticos, para a separação efetiva entre aromáticos e hidrocarbonetos saturados em misturas.¹¹⁷

Tais polímeros são produzidos quimicamente em geral pela policondensação entre dióis alifáticos ou aromáticos (dialquil, glicol cíclico ou difenil) e fosgênio ou carbonatos, na presença de hidróxido de sódio ou piridina,¹ podendo ainda ser sintetizados pela rota química via ROP.¹¹⁸ A Figura 6 exemplifica um tipo de reação possível para a síntese de policarbonatos, já incorporando uma enzima como catalisador.

No trabalho de Jiang *et al.*¹¹⁹ o produto comercial Novozym 435 foi utilizado como catalisador da policondensação entre dietil carbonato e 1,6-hexanodiol em solução de difenil éter. A reação gerou um poli(hexametileno carbonato) com massa molar média de 25.000 g/mol em um processo *two-steps* a 90 °C, similar ao apresentado na Figura 6. O processo químico requer temperaturas elevadas (>200 °C) devido à baixa atividade dos catalisadores organometálicos empregados quando aplicados sob temperaturas inferiores a esta.

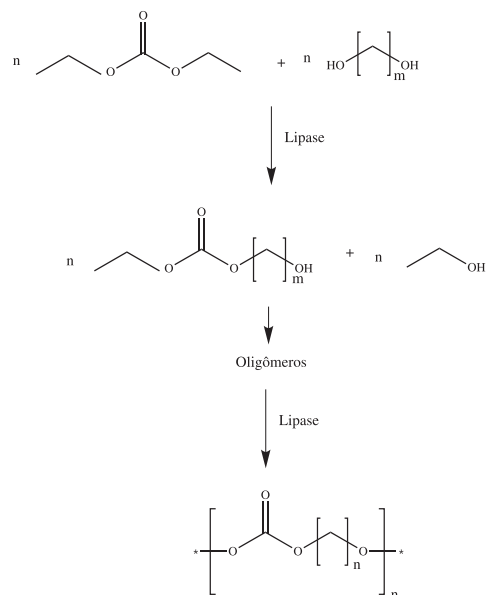


Figura 6. Reação geral da síntese de policarbonatos via policondensação enzimática (adaptado de Jiang *et al.*)¹¹⁹

A síntese enzimática de policarbonatos pode proceder com seletividade desejada sob condições brandas de reação, evitando assim reações laterais indesejadas. Além de necessitar de um aporte energético menor, a catálise enzimática não gera resíduos metálicos e outros subprodutos tóxicos. A rota enzimática de síntese de policarbonatos é bem similar à de síntese de outros poliésteres, e ocorre tanto por policondensação como por ROP. As enzimas mais empregadas são as lipases, e uma quantidade crescente de publicações tem reportado o uso do produto Novozym 435 e da lipase de pâncreas bovino (no caso de polímeros éster-seletivos), com temperaturas de reação entre 45-120 °C, obtendo-se massas molares médias maiores que 30.000 g/mol e rendimentos superiores a 95%.¹¹⁹

Outro exemplo do uso do produto enzimático Novozym 435 para a síntese de policarbonatos foi reportado por Rodney *et al.*¹²⁰ Os autores empregaram um sistema reacional com dióis aromáticos e carbonato de 1,3-propanodiol ou divinil adipato, obtendo produtos com massa molar baixa, de até 5.200 g/mol. As polimerizações foram conduzidas na presença de tetrahidrofurano sob temperaturas entre 70-110 °C por 24 h, ou ainda na ausência de solvente a 50 °C por 72 h.

APLICAÇÕES DE ENZIMAS NA MODIFICAÇÃO DE POLÍMEROS

O uso de biocatalisadores na área de polímeros não está restrito apenas a reações de síntese destas macromoléculas, mas também na modificação (funcionalização) e na degradação de diversos polímeros.

A maioria das investigações a respeito deste assunto tem versado sobre a modificação de polímeros de ocorrência natural (ou seus derivados), como por exemplo a formação de hidrogéis baseados em polissacarídeos. Um exemplo dessa aplicação é a gelificação de carboximetilcelulose pela introdução de grupos fenólicos, catalisada por uma peroxidase.¹²¹ O emprego da tecnologia enzimática também foi reportado para a modificação de polímeros sintéticos. Nesta área, o que mais se encontra é o uso de enzimas hidrolíticas atuando em diversos tipos de ligações, a saber: ligação éster em poliésteres (como o PET), ligação amida em PAs e ligação nitrila em poli(acrilonitrilas) (PAN). Na maioria das vezes o efeito desejado é um aumento da hidrofiliabilidade do polímero. Entretanto, outras reações podem ocorrer, como no caso da funcionalização do poli(etilenoglicol) (PEG)¹²² e na acilação de poliésteres, ambas catalisadas por lipases.¹²³ A Tabela 3S apresenta algumas enzimas que catalisam a hidrólise ou modificação da superfície de alguns polímeros, bem como os micro-organismos mais conhecidos que produzem estas enzimas.

Funcionalização de poli(etilenoglicol)

As lipases permitem funcionalizar poliésteres como o PEG. Entre outras coisas, elas podem catalisar a formação de dendrímeros de PEG em uma reação *two-step, one-pot*, em que primeiro a lipase catalisa a transesterificação de vinil acrilato em um polioliol, seguido de uma adição de Michael catalisada pela mesma enzima, formando grupos dietanolamina na ponta da cadeia polimérica.¹²⁴ Como outro exemplo desta área, tem-se a funcionalização de PEG comercial pela sua transesterificação com vinil ésteres, catalisada por uma lipase, resultando em polímeros PEG-acrilatos.¹²⁵

Modificação superficial de poli(etileno tereftalato)

A fibra de poli(etileno tereftalato) (PET) é uma das mais utilizadas mundialmente. Torna-se interessante para algumas aplicações que o PET apresente maior hidrofiliabilidade que aquele tradicionalmente obtido por rota química, resultando assim em características como: melhor adesão de tintas, modificação da textura de tintas e maior

biodegradação. Muitos estudos têm sido feitos a respeito da hidrólise enzimática superficial de fibras de PET. As principais enzimas utilizadas são as lipases e cutinases, catalisadores da hidrólise da ligação éster, gerando assim grupos hidroxil e carboxil na superfície do polímero. Os estudos reportam o uso dessas enzimas em temperaturas entre 40-55 °C, em meios que podem ser alcalinos, no caso de cutinases, ou ácidos, no caso da utilização de alguns tipos de lipases.¹²⁶⁻¹²⁸

CONCLUSÕES

As enzimas apresentam grande potencial para direcionar os processos industriais a vias de maior sustentabilidade. Um exemplo disso é a síntese enzimática de plásticos e fibras a partir de monômeros renováveis mais biodegradáveis que seus análogos petroquímicos, como por exemplo: polihidroxicanoatos, polilactídeos, policaprolactonas, poliésteres alifáticos, polissacarídeos, bem como copolímeros ou blendas destes.

Catalisadores enzimáticos, no entanto, ainda apresentam um custo mais elevado que catalisadores químicos, de forma que a sustentabilidade do processo e a possibilidade de obtenção de macromoléculas com propriedades diferenciadas (e assim, abrindo uma gama de novas aplicações) são as maiores motivações para o uso de enzimas como alternativa a rotas químicas bem estabelecidas para a síntese de polímeros de larga escala.

Em curto prazo, os biocatalisadores apresentam maior potencial de uso na síntese de polímeros com maior valor agregado, devido a suas propriedades especiais, ou de polímeros mais puros, com menor formação de resíduos e subprodutos. No entanto, em um futuro em que seja levado em conta todo o ciclo de vida do produto no seu valor final, acredita-se que as enzimas serão capazes de reduzir o passivo ambiental dos plásticos desde a síntese até sua reciclagem e/ou regeneração.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As Tabelas 1S a 3S estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, em arquivo pdf, com acesso livre.

REFERÊNCIAS

- Mano, E. B.; Mendes, L. C.; *Introdução a Polímeros*, 2ª ed., Edgard Blücher: São Paulo, 2004.
- Miletic, N.; Loos, K.; Gross, R.; Em *Biocatalysis in Polymer Chemistry*; Loos, K. (ed.); Wiley VCH-Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2011, cap. 4.
- Gross, R. A.; Ganesh, M.; Lu, W.; *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 435.
- Moura, C. V. R.; Nunes, A. S. L.; Moita Neto, J. M.; Neres, H. L. S.; Carvalho, L. M. G.; Moura, E. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1226.
- Kadokawa, J.-I.; Kobayashi, S.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 145.
- Gross, R. A.; Kalra, B.; Kumar, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 655.
- Jaeger, K. E.; Eggert, T.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390.
- Hunsen, M.; Azim, A.; Mang, H.; Wallner, S. R.; Ronkvist, A.; Xie, W.; Kobayashi, S.; Shoda, S. I.; Uyama, H.; *Adv. Polym. Sci.* **1995**, *121*, 1.
- Soares, C. M. F.; Santana, M. H. A.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 832.
- Girelli, A. M.; Salvagni, L.; Tarola, A. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 585.
- Kobayashi, S.; Uyama, H.; Em; Doi, Y.; Steinbuchel, A. *Polyesters I: Biological systems and Biotechnological Production*, 3ª ed., Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
- Kobayashi, S.; Ritter, H.; Kaplan, D.; *Enzyme-catalyzed synthesis of polymers*; 1ª ed., Springer-Verlag: Berlin, 2006.

13. Loos, K.; *Biocatalysis in Polymer Chemistry*; 1st ed., Wiley VCH-Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2011.
14. Palmans, A. R. A.; Heise, A.; *Enzymatic Polymerization*, 1st ed., Springer-Verlag: Berlin, 2010.
15. Wohlgemuth, R.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713.
16. Robert, C.; Montigny, F.; Thomas, C. M.; *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 586.
17. Clomburg, J. M.; Gonzales, R.; *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 867.
18. Lee, S.; Jeun, E.; Yun, H. S.; Lee, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *16*, 706.
19. Mandal, S. K.; Banerjee, P. C.; *Res. J. Microbiol.* **2006**, *1*, 190.
20. Yu, Y.; Wu, D.; Liu, C.; Zhao, Z.; Yang, Y.; Li, Q.; *Proc. Biochem.* **2012**, *47*, 1027.
21. Santos, M.; Gangoiti, J.; Llama, M. J.; Serra, J. L.; Keul, H.; Möller, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *77*, 81.
22. Liu, W.; Chen, B.; Wang, F.; Tan, T.; Deng, L.; *Proc. Biochem.* **2011**, *46*, 1993.
23. Kobayashi, S.; *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2010**, *86*, 338.
24. Maria, P. D.; Sinisterra, J. V.; Tsai, S.-W.; Alcantara, A. R.; *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 493.
25. Kumar, A.; Kulshrestha, A. S.; Gao, W.; Gross, R. A.; *Macromolecules* **2003**, *36*, 8219.
26. Goj, O.; Burchardt, A.; Haufe, G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 399.
27. Taguchi, S.; Yamada, M.; Matsumoto, K.; Tajima, K.; Satoh, Y.; Munekata, M.; Ohno, K.; Khoda, K.; Shimamura, T.; Kambe, H.; Obata, S.; *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17323.
28. Tajima, K.; Satoh, Y.; Satoh, T.; Itoh, R.; Han, X.; Taguchi, S.; Kakuchi, T.; Munekata, M.; *Macromolecules* **2009**, *42*, 1985.
29. Okada, M.; *Prog. Polym. Sci.* **2002**, *27*, 87.
30. Kartal, F.; Janssen, M. H. A.; Hollmann, F.; Sheldon, R. A.; Kilinc, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 85.
31. Dai, S.; Xue, L.; Zinn, M.; Li, Z.; *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3176.
32. Kobayashi, S.; Makino, A.; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5288.
33. Yang, Y.; Lu, W.; Cai, J.; Hou, Y.; Ouyang, S.; Xie, W.; Gross, R. A.; *Macromolecules* **2011**, *44*, 1977.
34. Ajellal, N.; Carpentier, J.-F.; Guillaume, C.; Guillaume, S. M.; Helou, M.; Poirier, V.; Sarazin, Y.; Trifonov, A.; *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8363.
35. Coady, D. J.; Fukushima, K.; Hendrick, J. L.; Horns, H. W.; Rice, J. E.; *US pat 20120046437*, 2010.
36. Jérôme, C.; Lecomte, P.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1056.
37. Albertsson, A. C.; Varma, I. K.; *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1466.
38. Kundu, S.; Bhangale, A. S.; Wallace, W. E.; Flynn, K. M.; Guttman, C. M.; Gross, R. A.; Beers, K. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *113*, 6006.
39. Srivastava, R. K.; Albertsson, A.-C.; *Macromolecules* **2006**, *39*, 46.
40. Albertsson, A.-C.; Srivastava, R. K.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1077.
41. Loeker, F. C.; Duxbury, C. J.; Kumar, R.; Gao, W.; Gross, R. A.; Howdlr, S. M.; *Macromolecules* **2004**, *37*, 2450.
42. Uyama, H.; Takamoto, T.; Kobayashi, S.; *Polymer Journal* **2002**, *34*, 94.
43. Namekawa, S.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; *Polymer Journal* **1998**, *30*, 269.
44. Taden, A.; Antonietti, M.; Landfester, K.; *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, *24*, 512.
45. Labet, M.; Thielemans, W.; *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3484.
46. Gross, R. A.; Kalra, B.; *Science* **2002**, *297*, 803.
47. Yang, Y.; Yu, Y.; Zhang, Y.; Liu, C.; Shi, W.; Li, Q.; *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1900.
48. Matsumoto, K.; Taguchi, S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 921.
49. Coates, G. W.; Jeske, R. C.; *Em Handbook of Green Chemistry*; Anastas, P. T., ed; Wiley VCH-Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2010, cap. 11.
50. Drumright, R. E.; Gruber, P. R.; Henton, D. E.; *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1841.
51. Koller, M.; Salerno, A.; Dias, M.; Reiterer, A.; Brauneegg, G.; *Food Technol. Biotechnol.* **2010**, *48*, 255.
52. Tokiwa, Y.; *Em: Biopolymers, v 9. Miscellaneous biopolymers and biodegradation of polymers*; Matsumura, S.; Steinbüchel, A., eds.; 1st ed. Wiley- VCH: Weinheim, 2002, cap 14.
53. Matsumura, S.; Soeda, Y.; Toshima, K.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 12.
54. Delaby, R.; Sekera, A.; Chabrier, P.; Pignaniol, P.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1953**, 273.
55. Kihara, N.; Kushida, Y.; Endo, T.; *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **1996**, *34*, 2173.
56. Hall, H. K.; Schneider, A. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6409.
57. McCabe, R. W.; Taylor, A.; *Green Chem.* **2004**, *6*, 151.
58. Owen, S.; Otani, T.; Masaoka, S.; Ohe, T.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 244.
59. Yanagishita, Y.; Kato, M.; Toshima, K.; Matsumura, S.; *ChemSusChem* **2008**, *1*, 133.
60. Soeda, Y.; Toshima, K.; Matsumura, S.; *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 277.
61. Hung, A. Y. C.; *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **2003**, *41*, 679.
62. Soeda, Y.; Toshima, K.; Matsumura, Y.; *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 721.
63. Kiatsimkul, P.; *Tese de Doutorado*, University of Missouri, Estados Unidos, 2006.
64. Schaffer, M. A.; McAuley, K. B.; Marchildon, E. K.; Cunningham, M. F.; *Macromol. React. Eng.* **2007**, *1*, 563.
65. Riehle, R. J.; *ACS Symp. Ser.* **2005**, *900*, 302.
66. Cheng, H. N.; *Em Biocatalysis in Polymer Chemistry*; Loos, K. (ed.); Wiley VCH-Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2011, cap. 5.
67. Mitchel, A. R.; *Biopolymers* **2008**, *90*, 175.
68. Pennington, M. W.; Dunn, B. M.; *Peptide Synthesis Protocol*, Humana Press: Totowa, 1994.
69. Deming, T. J.; *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 858.
70. Deopura, B. L.; Alagirusamy, R.; Joshi, M.; Gupta, B.; *Polyesters and Polyamides*, Taylor and Francis: Oxfordshire, 2008.
71. Cheng, H. N.; Gross, R. A.; *Polymer Biocatalysis and Biomaterials II*, American Chemical Society: Washington D.C., 2008.
72. Guzman, F.; Barberis, S.; Illanes, A.; *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 279.
73. Lombard, C.; Saulnier, J.; Wallach, J. M.; *Protein Pept. Lett.* **2005**, *12*, 621.
74. Cheng, H. N.; Gu, Q.-M.; Maslanka, W. W.; *US pat 6,677,427* **2004**.
75. Kumar, D.; Bhalla, T. C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 726.
76. Kawashiro, K.; Kaiso, K.; Minato, D.; Sugiyama, S.; Hayashi, H.; *Tetrahedron* **2005**, *49*, 4541.
77. Cheng, H. N.; Gu, Q.-M.; Maslanka, W. W.; *US Pat 6,677,427* **2004**.
78. Gu, Q.-M.; Maslanka, W. W.; Cheng, H. N.; *Em Polymer Biocatalysis and Biomaterials II*; Cheng, H.N.; Gross, R.A., eds; American Chemical Society: New York, 2008, cap 21.
79. Gu, Q.-M.; Maslanka, W. W.; Cheng, H. N.; *ACS Polym. Prepr.* **2006**, *47*, 234.
80. Poulhès, F.; Mouysset, D.; Gil, G.; Bertrand, M. P.; Gastaldi, S.; *Polymer* **2012**, *53*, 1172.
81. Huf, S.; Krugener, S.; Hirth, T.; Rupp, S.; Zibek, S.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 548.
82. Swartz, J.; Kim, D. M.; *US pat 6,337,191*, 2002.
83. Heinrich, C. P.; Fruton, J. S.; *Biochemistry* **1968**, *7*, 3556.
84. Ziegler, K.; Deutzmann, R.; Lockau, W. Z.; *Naturforsch.* **2002**, *57c*, 522.
85. Ferone, R.; Singer, S. C.; Hunt, D.F.; *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 16363.
86. Fukuoka, T.; Tachibana, Y.; Tonami, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S.; *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 768.
87. Ragupathy, L.; Ziener, U.; Dyllick-Brenzinger, R.; Vacano, B.; Landfester, K.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *76*, 94.
88. Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; *Polymers* **2012**, *4*, 759.
89. Sigg, S. J.; Seidi, F.; Renggli, K.; Silva, T. B.; Kali, G.; Bruns, N.; *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1710.
90. Churakova, E.; Kluge, M.; Ullrich, R.; Arends, I.; Hofrichter, M.; Hollmann, F.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *123*, 10904.

91. Hiner, A. N. P.; Hernández-Ruiz, J.; Williams, G. A.; Arnao, M. B.; García-Cánovas, F.; Acosta, M.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *392*, 295.
92. Puig, T. R.; Junghanns, C.; Demarche, P.; Moreira, M. T.; Feijoo, G.; Lema, J. M.; Agathos, S. N.; *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6593.
93. Curvetto, N. R.; Figlas, D.; Brandolin, A.; Saidman, S. B.; Rueda, E. H.; Ferreira, M. L.; *Biochem. Eng. J.* **2006**, *29*, 191.
94. Kim, Y-W.; Eom, G. T.; Hong, J-S.; Chung, K-W.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1727.
95. Witayakran, S.; Ragauskas, A. J.; *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187.
96. Cañas, A. I.; Camarero, S.; *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 694.
97. Nozoe, A.; Abe, M.; Ohto, K.; K, H.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2011**, *86*, 1374.
98. Nabid, M. R.; Entezami, A. A.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *94*, 254.
99. Liu, W.; Cholli, A. L.; Naharajan, R.; Kumar, J.; Tripathy, S.; Bruno, F.; Samuelson, L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11345.
100. Shero, E. J.; O'Brien, J. J.; Priddy, D. B.; *US pat 5,145,924*, 1991.
101. Singh, A.; Ma, D.; Kaplan, D. L.; *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 592.
102. Kwon, H-S.; Chung, E.; Lee, D-I.; Lee, C-H.; Ahan, I-S.; Kim, J-Y.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *112*, 2935.
103. Sakharov, I. Y.; Vorobiev, A. C.; Leon, J. J. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 661.
104. Kim, S.; Silva, C.; Evtuguin, D. V.; Gamelas, J. A. F.; Cavaco-Paulo, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 981.
105. Van As, B. A. C.; Thomassen, P.; Kalra, B.; Gross, R. A.; Meijer, E. W.; Palmans, A. R. A.; Heise, A.; *Macromolecules* **2004**, *37*, 8973.
106. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; *Bioquímica*, 5ª Ed., Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 2002.
107. Kobayashi, S.; *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 693.
108. Ohmae, M.; Fujikawa, S.; Ochiai, H.; Kobayashi, S.; *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 5014.
109. Castro, A. M.; Pereira Jr, N.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 181.
110. Tanaka, T.; Noguchi, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S.; *Chem. Commun.* (2008), doi:10.1039/B801090K.
111. Ziegast, G.; Pfannemuller, B.; *Carbohydr. Res.* **1987**, *160*, 185.
112. Nakamura, I.; Horikawa, Y.; Makino, A.; Sugiyama, J.; Kimura, S.; *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 785.
113. Janerat, A.; Tokima, Y.; *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 401.
114. Mark, H. F.; Bikales, N. M.; Overberger, C. G.; Menges, C.; *Encyclopedia of polymer science and engineering*, 2nd ed., Wiley: Nova York, 1988.
115. Jan, Y-S.; Lin, J-M.; Wang, M-H.; Wu, S-F.; *US pat 6,300,016 B1*, 2001.
116. Kojio, K.; Nonaka, Y.; Masubuchi, T.; Furukawa, M.; *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* **2004**, *42*, 4448.
117. Ho, W. S.; Sartori, G.; Thaler, W. A.; *US pat 5,756,643*, 1996.
118. Chen, X.; McCarthy, S. P.; Gross, R. A.; *Macromolecules* **1997**, *30*, 3470.
119. Jiang, Z.; Liu, C.; Xie, W.; Gross, R. A.; *Macromolecules* **2007**, *40*, 7934.
120. Rodney, R. L.; Allinson, B. T.; Beckman, E. J.; Russel, A. J.; *Biotechnol Bioeng.* **1999**, *65*, 485.
121. Ogushi, Y.; Sakai, S.; Kawakami, K.; *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 262.
122. Guebitz, G. M.; Cavaco-Paulo, A.; *Trends Biotechnol.* **2007**, *26*, 32.
123. Hagstrom, A. E. V.; Nordblad, M.; Adlercreutz, P.; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 693.
124. Puskas, J. E.; Seo, K. S.; Sen, M. Y.; *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 524.
125. Puskas, J. E.; Sen, M. Y.; Seo, K. S.; *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 2959.
126. Alisch-Mark, M.; Herrmann, A.; Zimmermann, W.; *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 681.
127. Donelli, I.; Taddei, P.; Smet, P. F.; Poelman, D.; Nierstrasz, V. A.; Freddi, G.; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 845.
128. Lee, S. H.; Song, W. S.; *Fibers Polym.* **2010**, *11*, 54.