



SÍNTSE DE NANO-SUPORTES POLIMÉRICOS HETEROFUNCIONAIS PARA A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA*

Stefanni de Sousa Everton

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia da Nanotecnologia.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Martin Schmal

Rio de Janeiro
Julho de 2021

SÍNTESE DE NANO-SUPORTES POLIMÉRICOS HETEROFUNCIONAIS
PARA A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA*

Stefanni de Sousa Everton

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO
ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE
ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DA NANOTECNOLOGIA.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Martin Schmal

Aprovada por: Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto
Prof. Eliane Pereira Cipolatti
Prof. Luciana Spinelli Ferreira

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
JULHO DE 2021

Everton, Stefanni de Sousa

Síntese de nano-suportes poliméricos heterofuncionais para a imobilização da Lipase B de *Candida antarctica* /Stefanni de Sousa Everton. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2021.

XVII, 97 p.: il.; 29, 7cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Martin Schmal

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia da Nanotecnologia, 2021.

Referências Bibliográficas: p. 79 – 93.

1. Nano-suportes Heterofuncionais. 2. Epóxido.
3. Lipases. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia da Nanotecnologia. III. Título.

*Ao Pai, ao Filho e Espírito
Santo e às mulheres da minha
vida: minha mãe Maria de
Fátima; minha queria avó
Genoca (in memoriam); e minha
nega Stella.*

Agradecimentos

”Quando o Senhor restaurou a sorte de Sião,

Nós ficamos como quem sonha.

Então, a nossa boca se encheu de riso,

E os nossos lábios, de louvor.

E se dizia entre as nações:

Grandes coisas fez o Senhor por eles.

Sim! Grandes coisas fez o Senhor por nós.

Por isso estamos alegres” Sl 126

A Ele, a glória, A Ele, louvor para todo o sempre.

A ti Pai, Filho e Espírito Santo, rendo a minha gratidão por ter me concedido a graça na finalização desse ciclo em minha vida e por me mostrar que eu poderia ser capaz, em meio a tantas dificuldades, como as saudades da família, de amigos e de lugares que marcaram a minha infância.

Agradeço às mulheres da minha casa: a minha mãe Fátima, a minha avô Genoca (in memoriam) e a minha irmã Stella, pela força que elas me dão para seguir e alcançar cada passo em minha vida. Em especial, a minha vó, que não fará parte desse momento, mas que sei que está sempre a interceder por mim no céus. Mãe, meu muito obrigada por todas as orações, incentivo e zelo, ao cuidar de mim e meus irmãos. A minha nega, irmã, amiga, intercessora e incentivadora.

A meu irmão Sthênio e meu papito Everton, pelo apoio e cuidado em todas as circunstâncias.

A meus pastores Rafael e Milene. A Debohra, Tâmara e Denir e a toda a família Bola de Neve Teresina, que foram incentivadores e apoiadores em todo o processo.

Ao André pela amizade, parceria, cuidado, apoio e amor nessa trajetória. Aos inúmeros amigos que fiz ao chegar ao Rio, em especial Luíza, Júlia, Amélia, Juliana, Gabriel, Demouthie, Hebert e Arthur pelas conversas, risosrsrsrsrsr, passeios e apoio: com certeza, sem vocês seria tudo mais difícil.

A meus queridos orientadores José Carlos e Schmal, por aceitarem a missão de me orientarem. Como orientadores, me ensinaram e mostraram o amor que eles têm pela pesquisa e ciência e nunca desistir frente a um obstáculo. Agradeço pelas conversas e discussões ao longo do desenvolvimento dessa pesquisa.

A Martina, que não foi minha orientadora no papel, mas sim no coração. Obrigada pelo incentivo, apoio do começo ao fim desta pesquisa e por compartilhar as dificuldades que todos os pesquisadores enfrentam ao longo de suas jornadas.

Aos técnicos e gerência do I 140 e EngePol, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa e por me presentearem com pessoas como o Bruno. Obrigada meu amigo por cada palavra, conselho, inúmeras risadas e por me apresentar o seu profissionalismo e amor em ensinar. Aos queridos Nicolis, Marcos e Carlinha (made in Bahia) pela amizade e a todos aqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram.

A Thalita, que me ajudou de forma incansável no desafio de realizar a primeira etapa desse trabalho.

Ao laboratório parceiro Labim, por me apresentar todas as meninas mulheres pesquisadoras. O meu muito obrigada a Eliane, pela ajuda nesse país enzimas e pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Aos queridos amigos da limpeza, em especial a Dona Rose pelas conversas. Aos guardas, pelo "bom dia" de sempre e momentos de conversas nos corredores. E a todos os técnicos das caracterizações, pois sem vocês seria difícil chegarmos à conclusão de nossos trabalhos, principalmente nesse universo nano.

Ao Programa de Engenharia da Nanotecnologia, por me dar a oportunidade de vivenciar essas experiências ao longo do mestrado.

E por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

"O processo de semeadura ao longo da vida é feito com lágrimas, mas tenhamos a certeza que o processo da colheita dos frutos será feito com alegria."

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

SÍNTSE DE NANO-SUPORTES POLIMÉRICOS HETEROFUNCIONAIS
PARA A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *CANDIDA ANTARCTICA*

Stefanni de Sousa Everton

Julho/2021

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Martin Schmal

Programa: Engenharia da Nanotecnologia

Nano-suportes heterofuncionais têm despontado no cenário de imobilização enzimática devido à minimização de problemas como dificuldades difusoriais e baixa área específica. Além disso, esses materiais se mostram promissores, em virtude da sua capacidade de interação específica com a superfície das lipases. Diante disso, o estudo teve o objetivo de sintetizar nano-suportes heterofuncionais utilizando os monômeros metacrilato de metila (MMA), divinilbenzeno (DVB) e o monômero funcional metacrilato de glicidila (GMA), a fim de desenvolver um suporte promissor para uso em imobilizações enzimáticas. Além disso, buscou-se encontrar a melhor relação suporte/enzima como função do grau de hidrofobicidade e funcionalidade da superfície. Com base nos resultados desse estudo foram sintetizados os nano-suportes de PMMA, P(MMA-*co*-DVB) e P(MMMA-*co*-DVB-*co*-GMA) com 25 % e 50 % de GMA, variando-se, portanto, a concentração do grupamento epóxido pertencente ao GMA. Finalmente, os nano-suportes produzidos tiveram os desempenhos avaliados em ensaios de hidrólise e esterificação, após a imobilização da enzima lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CAL B). Como resultado, foi observado que os nanobiocatalisadores que continham o grupamento epóxido apresentaram melhores desempenhos, sendo esses suportes caracterizados pelas altas áreas específicas, pronunciados volumes e diâmetros de poros e natureza hidrofílica. Além disso, não foi observada uma relação direta entre o grau de hidrofobicidade e a atividade dos biocatalisadores. Assim, foi possível constatar que o grupamento epóxido proporcionou um melhor desempenho dos biocatalisadores por aumentar a capacidade de carga enzimática e da interação desse grupamento com a lipase CAL B.

Palavras-chaves: Nano-suportes heterofuncionais, epóxido, lipases

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

SYNTHESIS OF HETEROFUNCTIONAL POLYMERIC NANOSUPPORTS
FOR THE IMMOBILIZATION OF LIPASE B FROM *CANDIDA ANTARCTICA*

Stefanni de Sousa Everton

July/2021

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Martin Schmal

Department: Nanotechnology Engineering

Heterofunctional nano-supports have emerged in the enzyme immobilization scenario due to the minimization of problems such as diffusion difficulties and low specific area. In addition, these materials are promising due to their ability to specifically interact with the surface of lipases. Therefore, this study aimed to synthesize heterofunctional nano-supports using the monomers methyl methacrylate (MMA), divinylbenzene (DVB), and the functional monomer glycidyl methacrylate (GMA), to develop promising support for use in enzyme immobilizations. In addition, it was sought to find the best support/enzyme ratio as a function of the degree of hydrophobicity and surface functionality. Based on the results of this study, PMMA, P(MMA-*co*-DVB) and P(MMMA-*co*-DVB-*co*-GMA) nano-supports were synthesized with 25 % and 50 % of GMA, thus varying the concentration of the epoxide group belonging to GMA. Finally, the nano-supports produced had their performances evaluated in hydrolysis and esterification reaction, after immobilization of the enzyme lipase from *Candida antarctica* type B (CAL B). As a result, it was observed that the nanobiocatalysts containing the epoxide group showed better performances, presenting high specific areas, pronounced pore volumes and diameters, and hydrophilic nature. Furthermore, no direct relationship was observed between the degree of hydrophobicity and the activity of the biocatalysts. Thus, it was found that the epoxide group provided a better performance of the biocatalysts by increasing the enzyme loading capacity and the interaction of this group with CAL B lipase.

Keywords: heterofunctional nanosupports, epoxide, lipases

Sumário

Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvi
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivos específicos	3
1.1.2 Estrutura da tese	4
2 Mapeamento de potenciais suportes a serem utilizados na imobilização da CAL B	6
2.1 Revisão bibliográfica	6
2.1.1 Lipases	6
2.1.2 Imobilização enzimática	9
2.1.3 Interação enzima/suporte	12
2.1.4 Aplicação de lipases imobilizadas	14
2.2 Materiais e métodos	15
2.2.1 Enzima	16
2.2.2 Suportes do grupo 1	16
2.2.3 Suportes do grupo 2	18
2.2.4 Reagentes utilizados	18
2.2.5 Equipamentos utilizados nos ensaios de imobilização e nas reações dos biocatalisadores	19
2.2.6 Grau de hidrofobicidade	19
2.2.7 Processo de imobilização por adsorção física	20
2.2.8 Curva cinética de imobilização	21
2.2.9 Rendimento	22
2.2.10 Reação de hidrólise	22
2.2.11 Reação de esterificação	23
2.3 Resultados e discussões	24

2.3.1	Análises para os suportes com baixa área específica	24
2.3.2	Análises para os suportes comerciais com diferentes áreas específicas	29
2.4	Considerações finais	31
3	Síntese de nano-suportes heterofuncionais	33
3.1	Revisão bibliográfica	33
3.1.1	Nanoestruturas	33
3.1.2	Nanopartículas poliméricas	35
3.1.3	Suportes heterofuncionais	39
3.1.4	Síntese dos nano-suportes heterofuncionais	43
3.1.4.1	Polimerização em emulsão	43
3.2	Materiais, metodologia e técnicas de caracterização	46
3.2.1	Produção dos nano-suportes heterofuncionais	46
3.2.2	Equipamentos usados na síntese e caracterização dos nano-suportes	47
3.2.3	Metodologia	48
3.2.4	Caracterização dos nano-suportes	49
3.2.4.1	Determinação da conversão e rendimento das reações	49
3.2.4.2	Distribuição de tamanhos de partícula	50
3.2.4.3	Área específica e porosidade	50
3.2.4.4	Microscopia eletrônica de varredura	51
3.2.4.5	Espectroscopia com transformada de Fourier - FTIR	51
3.3	Resultados	52
3.3.1	Análise da conversão e rendimento	52
3.3.2	Distribuição dos tamanhos de partícula	53
3.3.3	Área específica e porosidade	56
3.3.4	Microscopia eletrônica de varredura – MEV	58
3.3.5	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier-FTIR	60
3.3.6	Hidrofobicidade	62
3.3.7	Teste de estabilidade química	63
3.4	Considerações finais	64
4	Imobilização Enzimática nos Nano-suportes	65
4.1	Revisão bibliográfica	65
4.2	Materiais e metodologia	67
4.2.1	Enzima	67
4.2.2	Suportes	67
4.2.3	Reagentes	68

4.2.4	Processo de imobilização por adsorção física	68
4.2.5	Cinética de imobilização	68
4.2.6	Rendimento	69
4.2.7	Reação de hidrólise	69
4.2.8	Reação de esterificação	70
4.3	Resultados	71
4.4	Comparações entre os biocatalisadores	73
4.5	Considerações finais	76
5	Conclusões	77
5.1	Trabalhos futuros	78
Referências Bibliográficas		79
A Estrutura química dos monômeros utilizados na produção de cada suporte		94

Lista de Figuras

1.1	Organograma da tese	5
2.1	Resíduos de aminoácidos presentes na estrutura molecular enzimática da lipase CAL B (Desenho adaptado de [1]).	11
2.2	Características importantes enzima e suporte que devem ser considerados para que sejam usados em imobilizações enzimáticas.	13
2.3	Definição dos grupos de suportes usados no presente trabalho	16
2.4	Tensiômetro utilizado para a medição do ângulo de contato.	20
2.5	Esquema do protocolo estabelecido para a construção da curva de imobilização.	22
2.6	Cinéticas de imobilização da lipase avaliadas com os suportes hidrofílicos (Polímero de amido, P(MMA- <i>co</i> -cardanol, PMMA_nanocelulose - cristais, PMMA_nanocelulose - fibras e Poli(succinato de etileno).	26
2.7	Cinéticas de imobilização da lipase avaliados com os suportes hidrofóbicos (PDEAEMA, PDMAEMA, Poli(ácido glicólico), P(S- <i>co</i> -DVB- <i>co</i> -GMA), Poliestireno).	27
2.8	Cinéticas de imobilização da lipase avaliadas para os suportes PP, PP/PS e Poli(butileno succinato).	28
2.9	Influência do grau de hidrofobicidade. a) atividade de hidrólise e b) atividade de esterificação dos biocatalisadores.	29
2.10	Curvas cinéticas de imobilização da lipase avaliadas com os suportes comerciais.	30
2.11	Influência do grau de hidrofobicidade de suportes comerciais no desempenho de biocatalisadores obtidos da imobilização de lipase B de <i>Candida antarctica</i> . (a) atividade de hidrolise e (b)atividade de esterificação. a) atividade de hidrólise e b) atividade de esterificação. . .	31
3.1	Funcionalidades características e manipuláveis de uma nanopartícula.	36
3.2	Representação esquemática das técnicas usadas para a produção de nanopartículas poliméricas.	37

3.3	Estrutura química do monômero GMA	41
3.4	Reator empregado para a síntese dos nano-suportes.	49
3.5	Conversões totais dos monômeros nas reações de PMMA, P(MMA-co-DVB), P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.	53
3.6	Rendimento totais dos nano-suportes à base de PMMA, P(MMA-co-DVB), P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.	54
3.7	Distribuições dos tamanhos de partícula nos látexes de PMMA, P(MMA-co-DVB) e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 %.	55
3.8	Distribuições de tamanho das partículas após a liofilização dos nano-suportes PMMA, P(MMA-co-DVB), P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.	56
3.9	Analise de fisssorção por nitrogênio. a) PMMA) e b) P(MMA-co-DVB).	57
3.10	Analise de fisssorção por nitrogênio. a) P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e b) P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.	57
3.11	Micrografias de MEV do nano-suporte PM com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.	59
3.12	Micrografias de MEV do nano-suporte PMD com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.	59
3.13	Micrografias de MEV do nano-suporte PMDG 25 % com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.	60
3.14	Micrografias de MEV do nano-suporte PMDG 50 % com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.	60
3.15	Espectros de FTIR para o PMMA e P(MMA-co-DVB).	61
3.16	Espectros de FTIR do P(MMA-co-DVB) e P(MMA-co-DVB-GMA) 25 %.	61
3.17	Espectros de FTIR do P(MMA-co-DVB) e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.	62
3.18	Espectros de correlação dos FTIR dos diferentes materiais. a) PM x PMD b) PMD x PMDG 25 % e c) PMDG 25 % x PMDG 50 %	62
3.19	Teste de solubilidade de amostras em THF	63
4.1	Representação esquemática para produção de nanobiocatalisadores a partir de nano-suportes heterofuncionais [2] (Desenho adaptado de [1]).	66
4.2	Cinéticas de imobilização da CAL B sobre os nano-suportes preparados.	73
4.3	Relação entre grau de hidrofobicidade e atividade de hidrólise para os biocatalisadores preparados.	74

4.4 Relação entre grau de hidrofobicidade e atividade de esterificação para os biocatalisadores preparados.	74
A.1 Suportes usados nas imobilizações.	95
A.2 Suportes usados nas imobilizações.	96
A.3 Suportes usados nas imobilizações.	97

Lista de Tabelas

2.1	Lista dos suportes do grupo 1 (baixa área específica) utilizados nos ensaios de imobilização da lipase CAL B.	17
2.2	Lista dos suportes do grupo 2 (comerciais) utilizado na imobilização da lipase CAL B.	18
2.3	Parâmetros obtidos para os biocatalisadores com baixa área específica com carga enzimática inicial de 200 U/g (A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, A_{hidro} = atividade de hidrólise e A_{ester} = atividade de esterificação).	25
2.4	Parâmetros obtidos para os suportes comerciais com carga inicial enzimática de 200 U/g. A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, A_{hidro} = atividade de hidrólise e A_{ester} = atividade de esterificação.	30
3.1	Reações obtidas de copolimerização conduzidas para a preparação dos nano-suportes.	48
3.2	Tamanho médios das partículas presentes nos látex e nos materiais e liofilizados.	56
3.3	Propriedades texturais dos nano-suportes secos produzidos.	58
3.4	Hidrofobicidade dos nanosuportes	63
4.1	Descrição dos reagentes utilizados nos ensaios de imobilização por adsorção física.	68
4.2	Parâmetros obtidos para os nanobiocatalisadores com carga inicial enzimática de 176 U/g. A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, A_{hidro} = atividade de hidrólise e A_{ester} = atividade de esterificação.	71
4.3	Parâmetros obtidos para os nanobiocatalisadores. A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, A_{hidro} = atividade de hidrólise e A_{ester} = atividade de esterificação.	75

Lista de Abreviaturas

A _{esp}	Área superficial específica, p. 19
A _{ester}	Atividade de esterificação, p. 16
A _{hidro}	Atividade de hidrólise, p. 16
AAM	Acrilamida, p. 32
Asp	Ácido Aspártico, p. 5
BTL	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> , p. 8
CAL A	<i>Candida antarctica</i> do tipo A, p. 6
CAL B	<i>Candida antarctica</i> do tipo B, p. 2
CMC	Concentração micelar crítica, p. 5
DVB	Divinilbenzeno, p. 31
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 12
EngePol	Laboratório de Engenharia de Polimerização, p. 12
FTIR	Espectroscopia com transformada de Fourier, p. 39
GMA	Metacrilato de glicidila, p. 2
GPC	Cromatografia de permeação em gel, p. 39
Glu	Ácido glutâmico, p. 5
HEMA	2-Hidroxietil metacrilato, p. 32
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i> , p. 6
His	Histidina, p. 5
KPS	Persulfato de potássio, p. 39

LSS	Lauril sulfato de sódio, p. 39
LTL	<i>Thermomyces lanuginosus</i> , p. 8
MET	Microscopia eletrônica de transmissão, p. 27
MEV	Microscopia eletrônica de varredura, p. 27
MFA	Microscopia de força atômica, p. 27
MMA	Metacrilato de metila, p. 31
MVT	Microscópio de varredura por tunelamento, p. 27
PBS	Poli(succinato de butíleno), p. 12
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i> , p. 23
PES	Poli(succinato de etíleno), p. 12
PGA	poli(ácido glicólico), p. 12
PMMA	Poli(metacrilato de metila), p. 3
PNL	<i>p</i> -Nitrofenila, p. 16
PNPA	Acetato de <i>p</i> -nitrofenila, p. 6
PNPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila, p. 6
RI	Rendimento de imobilização, p. 16
SPM	Microscópios por varredura de sensor, p. 27
STM	Microscópio de corrente por tunelamento, p. 27
Ser	Serina, p. 5
r	Rendimento, p. 42

Capítulo 1

Introdução

Uma das áreas da Biotecnologia que ganhou destaque nos últimos anos é a Biocatálise, que tem como principal interesse a utilização de enzimas em bioprocessos verdes e sustentáveis [3], [4], [5]. As enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos que atuando sobre um determinado substrato, reagente das reações catalisadas por enzimas, são capazes de promover e acelerar as reações químicas [6].

O interesse por esses biocatalisadores cresceu industrialmente devido à sua especificidade inerente, que desfavorece a não formação de subprodutos indesejáveis. No entanto, devido à sua origem biológica, esses catalisadores são instáveis, quase sempre solúveis em água e atuam sobre os substratos em condições fisiológicas brandas, dificultando o seu uso industrial [3], [5]. Por isso, a imobilização enzimática constitui uma estratégia adotada para aplicações em larga escala, com o objetivo de restringir a mobilidade e solubilidade da enzima. Dentre as vantagens da técnica de imobilização podem ser citadas a diminuição de subprodutos indesejada, a possibilidade de reutilização da enzima com baixa perda de eficiência, a possibilidade de descarte não agressivo ao meio ambiente [7] e o possível aumento da estabilidade [6].

Os fatores que determinam a eficiência desses biocatalisadores são as propriedades do suporte, o método de imobilização e o tipo de enzima [8]. Os suportes sólidos podem ser usados para imobilizar as enzimas por diferentes vias, tais como adsorção física, ligações covalentes, encapsulamento, dentre outros [9]. A depender da natureza das ligações geradas, pode haver mudança na conformação da enzima, que constitui um dos fatores que afetam a relação enzima/suporte [8].

A utilização de enzimas imobilizadas em nanopartículas poliméricas permitem obter algumas vantagens em relação à eficiência dos biocatalisadores, tais como o aumento da área de contato com o meio reacional máxima por unidade de massa, a redução das limitações difusionais e o aumento da carga enzimática efetiva, como resultado da elevada área específica [10], [11]. Além disso, pode ocorrer também um aumento de atividade devido à modificação da mobilidade e conformação do

catalisador imobilizado na superfície das partículas e à mobilidade natural das nanopartículas, sujeitas ao movimento Browniano quando suspensas em um meio contínua [12]. Por conta dessas características das nanopartículas poliméricas elas podem ser utilizadas com vantagens em aplicações biomédicas, no encapsulamento enzimático, para a transfecção de DNA, na produção de bio-sensores, aplicações de liberação de fármacos dentre outros. [13], [14], [15]

Uma forma de melhorar as propriedades de um suporte é a inserção de grupos funcionais na superfície, com a finalidade de promover a interação do ligante com a funcionalidade presente na superfície das nanopartículas [16],[17]. Os principais grupamentos funcionais utilizados para este fim são tióis, dissulfetos, aminas, nitrilos, ácidos carboxílicos, fosfinas e grupos funcionais associados à imobilização de biomoléculas [18].

Com o intuito de desenvolver um suporte que permite uma melhor interação enzima-suporte, surge o interesse na preparação de suportes heterofuncionais. Esses novos suportes apresentam distintas funcionalidades na superfície, sendo capazes de interagir com as enzimas por mais de uma via de imobilização, que pode ser inclusive manipulada por meio da mudança do pH do meio reacional. Assim, os suportes heterofuncionais apresentam a capacidade de minimizar problemas comuns enfrentados durante a imobilização, aumentando a estabilidade das enzimas por conta da formação de ligações multipontuais [19].

Dentre os diversos nano-suportes heterofuncionais utilizados, aqueles que contêm grupamento epóxido na superfície têm ganhado notoriedade, por conta da alta reatividade desse grupamento [20]. Dentre os monômeros que contêm o grupamento epóxido, pode-se citar especialmente o metacrilato de glicidila (GMA). Copolímeros à base de GMA podem ser produzidos com uma gama de outros monômeros para serem utilizados como suportes para imobilização de enzima, pois este grupamento epóxido tem a capacidade de interagir com diversos grupos químicos. Por esse mesmo motivo, o GMA também interage com diversos grupamentos nucleofílicos presentes na estrutura molecular enzimática, tais como tióis, aminas primárias, hidroxilas e ácidos carboxílicos [20].

Diante desse cenário, o principal objetivo do presente trabalho foi a síntese de nano-suportes heterofuncionais para imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CAL B), visando a avaliar como as propriedades dos suportes afetam o desempenho final do biocatalisador. A enzima CALB foi escolhida para o presente estudo porque essa enzima tem sido amplamente utilizada em muitas aplicações de interesse comercial, associadas à condução de reações de hidrólise e esterificação [21], [22], [23].

Numa primeira etapa, foram imobilizados 24 suportes em escala micrométrica com a CAL B, com o intuito de avaliar o desempenho desses materiais e escolher

uma composição adequada para a síntese dos nano-suportes. Uma vez escolhidos esses materiais, dentre os quais está o monômero funcional GMA, foram sintetizadas matrizes em nanoscalas, sobre os quais foram imobilizadas a carga enzimática de CAL B, posteriormente testadas em reações de hidrólise e esterificação. Adicionalmente, foram também avaliados os efeitos de porosidade, área específica, grau de hidrofobicidade e influência do grupo funcional epóxido sobre os desempenhos dos biocatalisadores.

1.1 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi o de realizar a produção de nano-suportes heterofuncionais funcionalizados com o grupamento epóxido, visando analisar o desempenho dos suportes obtidos em imobilizações enzimáticas usando a lipase *Candida antarctica* do tipo B (CAL B).

1.1.1 Objetivos específicos

- Encontrar a melhor relação enzima-suporte como função da hidrofobicidade por meio de um mapeamento de suportes micrométricos, utilizando matrizes com baixa área específica e um grupo de suportes comerciais porosos como referência;
- Imobilizar a lipase CAL B e avaliar sobre os suportes obtidos e a eficiência do processo de imobilização por meio da caracterização das atividades de hidrólise, esterificação e rendimentos em reações enzimáticas conduzidas com esses biocatalisadores;
- Sintetizar nano-suportes heterofuncionais com auxílio da técnica de polimerização em emulsão e caracterizar os suportes sintetizados, a saber, PMMA, P(MMA-*co*-DVB), P(MMA-*co*-DVB-*co*-GMA) contendo 25 % e 50 % em massa de GMA, por meio da composição, da porosidade, da resistência química e da morfologia dos materiais obtidos.
- Avaliar o desempenho dos nano-suportes heterofuncionais na imobilização da CAL B e nas reações de hidrólise e esterificação conduzidas com as enzimas imobilizadas.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) do Programa de Engenharia Química (PEQ) do Instituto Luiz Alberto Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia (COPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Nós agradecemos também a

colaboração do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

1.1.2 Estrutura da tese

A dissertação é constituída por cinco capítulos, sendo que neste é apresentando uma introdução sobre algumas temáticas discorridas ao longo desta dissertação.

No Capítulo II é apresentado uma revisão bibliográfica sobre lipases, imobilização enzimática, importância nas interações enzima/suporte e um breve apanhado sobre as aplicações de enzimas imobilizadas. Na seção 2.2 tem-se a descrição dos materiais utilizados no mapeamento de potenciais biocatalisadores e a metodologia adotada na imobilização dos suportes. Nas seções 2.3 e 2.4 são apresentado os resultados e algumas considerações para esta etapa do trabalho.

No Capítulo III é apresentada uma revisão sobre nanopartículas, o uso de suportes heterofuncionais como potenciais biocatalisadores e processos de sínteses empregados na obtenção de nano-suportes. Na seção 3.2 é apresentada a produção das nanopartículas por meio da técnica de polimerização em emulsão e técnicas aplicadas na caracterização das nanopartículas como distribuição de tamanho de partícula, determinação da área específica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR). Os resultados e a conclusão da produção dos nano-suportes heterofuncionais são apresentados na seção 3.3 e 3.4.

No Capítulo IV uma recapitulação dos capítulos II e III, assim como observações dos capítulos anteriores. Na seção 4.2 é apresentada o processo de imobilização nos nano-suportes heterofuncionais produzidos no Capítulo III e a caracterização destes biocatalisadores em reações de hidrólise e esterificação. Nas seções 4.3, 4.4 e 4.5 são apresentados os resultados do desempenho dos nanobiocatalisadores, um comparativo entre alguns biocatalisadores do Capítulo II e III e algumas considerações finais, respectivamente.

No Capítulo V são apresentadas algumas conclusões para o trabalho desenvolvido. Na seção 5.1 é apresentado algumas perspetivas de trabalhos futuros no estudo de biocatalisadores.

No Apêndice A é apresentado estruturas químicas dos suportes estudados no Capítulo II.

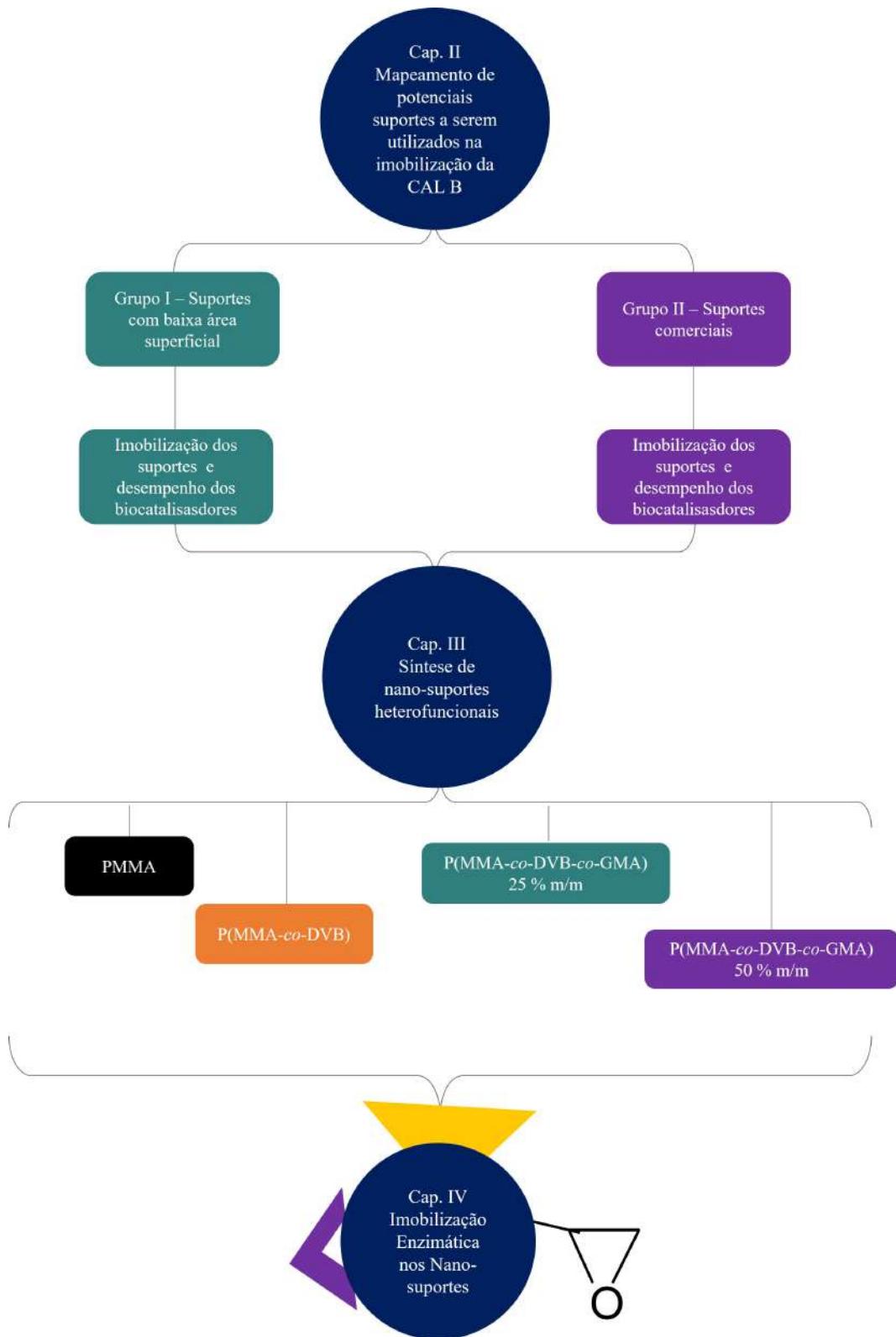


Figura 1.1: Organograma da tese

Capítulo 2

Mapeamento de potenciais suportes a serem utilizados na imobilização da CAL B

Este capítulo apresenta o mapeamento de potenciais suportes para serem empregados em imobilizações com a lipase CAL B. Além disso tendo como objetivo as interações enzima/suporte como função da hidrofobicidade. Para isto, na seção 2.1 é apresentada uma revisão bibliográfica abordando o uso da lipase CAL B em imobilizações e técnicas de imobilização. Ainda algumas propriedades importantes como hidrofobicidade, grupamento funcional e estabilidade química dos suportes devem ser levadas em contas para o melhor entendimento da interação enzima/suporte. Na seção 2.2 é apresentado os grupos de suportes empregados para o mapeamento de potenciais biocatalisadores na imobilização com a lipase B de *Candida antarctica* e a metodologia de adsorção física empregada nas imobilizações dos suportes. Na seção 2.3 são apresentados os resultados para o desempenho dos grupos de biocatalisadores nas reações de hidrólise e esterificação. Além disto, na seção 2.4 são apresentadas algumas considerações com base nos resultados obtidos dos biocatalisadores.

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Lipases

As enzimas são proteínas de estrutura complexa que funcionam como catalisadores de reações bioquímicas. Essas moléculas participam de reações como aminólise, acidólise, alcoólise com a finalidade de exercer o controle metabólico, catalisando a transformação de uma ampla gama de substratos [24]. O tamanho do mercado comercial de enzimas foi de US \$ 585,56 milhões em 2020 com expectativas de crescimento para até US \$ 961,85 milhões em 2028. O mercado comercial de enzimas

é muito expressivo por conta da aplicabilidade desses biocatalisadores em vários setores, como de alimentos, cuidados domésticos, agroenergia, farmacêutico e biotecnológico [25].

Lipases constituem uma classe de enzimas que está entre as mais estudadas na biocatálise. Esses biocatalisadores são valiosos para indústria, pois conseguem catalisar uma ampla gama de reações importantes na presença de água, como hidrólise, esterificação, transesterificação, alcoólise, aminólise, dentre outras [26]. Essas reações geralmente ocorrem na interface água/óleo porque os substratos são usualmente pouco solúveis na água. Diante disso, essas enzimas conseguem ser usadas para a transformação de vários substratos, pois, além dos lipídeos, podem catalisar as transformações de outras moléculas, como amidas e tioésteres [27]

Outro fator que atrai o uso das lipases no ambiente industrial diz respeito às especificidades que apresentam quanto à forma de hidrólise do substrato. Essas enzimas são caracteristicamente regiosseletivas, podendo atuar seletivamente em uma determinada posição dentro da molécula, distinguindo por exemplo as posições externas e internas do grupamento éster presente na molécula do substrato triacilglicerol [7]. Além disso, as lipases apresentam especificidade em relação ao tamanho da cadeia e ao número de insaturações dos ácidos graxos envolvidos. Nesse sentido, as lipases são quimiosseletivas e geram produtos específicos, atuando apenas sobre o grupo funcional pertencente ao substrato particular da enzima. Além disso, essas enzimas são capazes de distinguir enantiômeros de um racemato, sendo assim, enantioespecíficas [28].

A fonte de obtenção das lipases pode ser animal, microbiana e vegetal. Dependendo da sua fonte as enzimas podem apresentar diferentes estabilidades ao pH, especificidade e termoestabilidade. A fonte mais empregada em escala industrial é a microbiana. Atualmente, as lipases microbianas são produzida por diversas empresas como a Novozyme e Enzymocore, representando cerca de 40% do pool de enzimas comercializadas, devido às muitas vantagens por este grupo de compostos enzimáticos como explanadas anteriormente [10].

Segundo PETERSEN *et al.* [29], as lipases podem atingir uma atividade máxima no intervalo de pH 6 e 10. Valores de pH acima desta faixa podem ocasionar uma desestabilização da estrutura da enzima e ocasionar a perda de sua funcionalidade. Dependendo da origem, as lipases podem apresentar massa molar variando entre 20 e 75 KDa e temperaturas ótimas de atuação entre 25 e 70°C.

A maioria das lipases está sujeita ao mecanismo de ativação interfacial, já que o sítio catalítico é protegido do meio reacional por uma tampa polipeptídica móvel, localizada dentro de uma cavidade hidrofóbica. A tampa pode estar associada com a capacidade conformacional da enzima de expor ou não o sítio ativo para que se ligue ao substrato na presença de uma interface hidrofóbica [30],[31]. Al-

guns trabalhos mostram que algumas classes de lipases (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antartica* B) possuem a tampa hidrofóbica, embora estas possam não exibir o fenômeno de ativação interfacial [32], [33].

BRADY *et al.* [34] e SCHRAG *et al.* [35] mostraram as estruturas cristalinas das lipases, tanto na conformação aberta quanto fechada, explicando assim o característico fenômeno de ativação interfacial quando a lipase se mostra mais ativa sobre uma superfície adequada por apresentar uma conformação mais aberta e mais acessível ao substrato. As lipases têm o sítio catalítico formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico ou glutâmico (Asp/Glu), os quais são responsáveis pela transformação do substrato [36].

O substrato pode ser encontrado na forma solúvel ou dispersa na forma de emulsão. Assim, a ativação interfacial pode estar também relacionada com o aumento da atividade da lipase na presença dos substratos insolúveis que formam a emulsão. Quando os substratos encontram-se na forma solúvel, eles estão abaixo da concentração micelar critica (CMC) e esta baixa concentração pode dificultar o fenômeno de ativação interfacial. Nessa condição, pode não ocorrer a formação de uma área superficial favorável emulsionada, o que pode constituir um impedimento para a exposição do conteúdo hidrofóbico da lipase, gerando uma baixa capacidade catalítica de hidrólise para as lipases [36], [37], [38].

A levedura *Candida antarctica* produz duas diferentes lipases, denominadas A e B. Estas enzimas CAL A e CAL B foram encontradas na Antártida, quando pesquisadores buscavam a obtenção de enzimas resistentes a condições extremas [21]. Foi descoberto que essas lipases possuem elevada termoestabilidade e são estáveis em uma ampla faixa de pH. Em especial, a CAL B tem a capacidade de catalisar uma variedade de reações orgânicas e de tolerar grandes variações nas condições experimentais [22], [39].

Por conta dessa versatilidade e robustez, a CAL B tem sido amplamente usada na indústria e em pesquisas, em particular por conta das altas enanti e regiosseletividade para substratos de baixa massa molar e às altas atividades catalíticas. Diferentemente de outras lipases, a CAL B não é tão eficiente na hidrólise de triglicerídeos, embora seja estereoespecífica na hidrólise e na síntese de ésteres, que muitos atribuem ao pequeno espaço encontrado em sua bolsa hidrofóbica [40], [41].

O pH ideal do meio para a CAL B na catálise de reações é 7; no entanto, ela é estável em meio aquoso na faixa de pH entre 3,5 e 9,5. Por meio do processo de imobilização, esta enzima pode adquirir maior termoestabilidade, podendo ser utilizada na faixa de temperatura entre 60 e 80°C sem perda efetiva de atividade [21], [22]. Além dessas características, LI *et al.* [23] mostraram por meio de simulações moleculares que a CAL B apresenta estabilidade tanto em solventes orgânicos polares,

como acetona e acetonitrila, quanto em solventes apolares, diferentemente da maior parte das enzimas, que é estável apenas em solvente apolares. Ademais, os mesmos autores verificaram que a força de interação entre o sítio ativo e as moléculas do solvente polar são bastante intensas.

A CAL B é composta por 317 resíduos de aminoácidos e tem massa molecular de 33 kDa, com tamanho dimensões em torno de 30 Å x 40 Å x 50 Å [39], [42]. Como nas demais lipases, o centro ativo dessa lipase é a tríade Ser-His-Asp, é a responsável pela atividade catalítica da CAL B.

O sítio ativo da CAL B apresenta um formato de funil elíptico. A largura da base do funil é de 4,5 Å e na entrada do local para o sítio ativo é de 9,5 Å. [38] [43]. Em torno do sítio ativo são encontradas duas hélices que bastante flexíveis e que, dependendo das condições de trabalho, poderiam funcionar como uma tampa. A presença dessa tampa no sítio ativo tem gerado bastante discussões no campo científico a respeito da ocorrência ou não da ativação interfacial. A parte interna do canal é bastante hidrofóbica, contudo, a parte superior conta apenas com uma pequena região hidrofóbica, que evitam a formação de dímeros lipase-lipase [44], [45].

MARTINELLE *et al.* [46], por meio do estudo de ativação interfacial com as lipases CAL A, CAL B e *Humicola lanuginosa* (HLL), verificaram que a CAL B não apresentou qualquer ativação interfacial quando esteve em contato com os substratos butirato *p*-nitrofenila (PNPB) e acetato de *p*-nitrofenila (PNPA). No entanto, para as lipases CAL A e HLL foi observada a ativação das enzimas logo após o limite de saturação do substrato ser atingido.

As enzimas apresentam uma estrutura molecular complexa, que atuam usualmente sob condições suaves e sob determinadas condições podem sofrer inativação; ou seja, perda da sua capacidade catalítica. Fatores como calor, pH extremos e misturas com solventes orgânicos podem levar à perda da estrutura terciária, levando à sua desnaturação [20]. O uso de enzimas solúveis no meio reacional pode induzir o surgimento de dificuldades operacionais, como o alto custo das operações de separação, purificação, recuperação e a contaminação do produto final. Isso pode tornar a reutilização economicamente dispendiosa para a indústria [47].

2.1.2 Imobilização enzimática

Com o objetivo de potencializar algumas propriedades enzimáticas a exemplo, aumento das atividades em reações e estabilidade térmica algumas técnicas tem sido desenvolvidas, tais como modificações químicas, construção de moléculas com apoio de princípios da engenharia, imobilização e adição de aditivos para estabilização [48]. Nesse contexto, a possibilidade de trabalhar em altas temperaturas reacionais

permite o aumento das taxas de reação, a eliminação de problemas relacionados à contaminação, entre outras. Com a finalidade de contornar estes inconvenientes, principalmente em escalas industriais, tem sido utilizada técnica de imobilização de enzimas sobre suportes insolúveis, que facilita a separação do biocatalisador do meio reacional e permite assim o reuso, além de estabilização térmica e química [49].

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das enzimas, ou localizadas numa região definida do espaço, com a contenção das suas atividades catalíticas podendo ser usadas em ciclos de reuso continuamente. Nesse cenário, existem diferentes métodos de imobilização e cada um afeta de alguma forma no processo. Esses métodos podem ser divididos em duas grandes classes: métodos de encapsulamento e métodos baseados na formação de ligações físicas e químicas.

A técnica de encapsulamento consiste em confinar uma dada proteína dentro de uma matriz polimérica microporosa, em que os poros proporcionam proteção e preservação da enzima encapsulada, impedindo o contato direto com o meio reacional, minimizando assim eventuais problemas de inativação [8]. Apesar disto, esta técnica apresenta desvantagens em relação à existência de limitações para a transferência de massa e difusão do substratos devido aos diferentes tamanhos de poros existentes nos suportes. [8], [50].

No processo de imobilização o suporte é normalmente embebido numa solução enzimática, ao passando em seguida por um processo de agitação, que leva ao final o biocatalisador (enzima/suporte). Com base nessa metodologia forças de atração que se estabeleceram entre a enzima e o suporte podem ser de natureza iônica, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações químicas [48], [50].

As ligações das enzimas com os suportes podem ocorrer tanto por meio de ligação física quanto química (covalente). A adsorção física constitui um processo simples em virtude das interações que estão envolvidas entre a enzima e suporte. Nesse caso, a estrutura conformacional da enzima é pouca afetada, pois a enzima é imobilizada segundo uma orientação preferencial e energeticamente favorável [51], [52]. A grande desvantagem desse método está associada à sensibilidade a perturbações que podem ocorrer no meio, como mudanças de pH, de temperatura e tipo de solvente, que podem provocar a dessorção das enzimas da superfície do suporte [8], [48].

O método por adsorção física é bastante explorado na imobilização de lipases [53], [54]. Devido ao fenômeno de ativação interfacial encontrada em alguns grupos de lipases, as interações hidrofóbicas são mais comumente usadas para promover as imobilizações, pois a enzima em contato com superfícies hidrofóbicas tende a mudar sua conformação fechada para a aberta, expondo o sítio ativo para o meio reacional. CABRERA *et al.* [55] usaram a técnica de imobilização por adsorção física para imobilizarem a CAL B em diferentes suportes comerciais. Por meio do ensaio de dessorção mostraram que provavelmente as interações envolvidas entre a enzima e os

suportes seriam hidrofóbicas e que estas foram suficientes para produzir mudanças nas características das enzimas, resultando em alterações enantioseletividade, enantioespecificidade e atividade.

FERNANDEZ-LORENTE *et al.* [56] investigaram os efeitos da ativação interfacial de diferentes lipases, *Candida antarctica* tipo B (CAL B), *Thermomyces luginosus* (LTL) e *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL), immobilizadas nos suportes hidrofóbicos hexil- e butil-toyopearl e butil- e octil-agarose. Nos ensaios de dessorção puderam avaliar que, dependendo da enzima immobilizada, diferentes concentrações de tensoativos eram necessárias para promover a dessorção da enzima, indicando assim que, além das forças de adsorção exercidas, deve-se levar em conta o tipo e as características da lipase. Assim, o número de interações geradas entre enzima e o suporte determinam o quanto forte é essa ligação.

As immobilizações por ligações covalentes consistem na ligação entre o suporte e a enzima por meio de ligações químicas entre grupamentos funcionais. Este método, quando bem sucedido, garante uma boa estabilidade para a enzima, impedindo a dessorção mesmo em ambientes com alta força iônica. Em geral, os suportes utilizados precisam ser ativados para serem capazes de formar ligações químicas, pois a maioria não possui grupos reativos capazes de se ligarem diretamente a enzimas [22], [48].

O sítio ativo das enzimas apresenta resíduos de aminoácidos formados por grupos carboxílicos (aspárticos e glutâmicos), aminos (lisina), hidroxilas (serina) e sulfidrilas (cistina) que são grupamentos funcionais pertencentes às cadeias laterais não sendo essenciais para a atividade catalítica da enzima. A melhor maneira de atingir alto níveis de atividade enzimática numa ligação covalente é quando os grupamentos do sítio ativo não estão envolvidos na ligação com o suporte [57], [58]. A Figura 2.1 ilustra os resíduos de aminoácidos presentes na estrutura molecular.

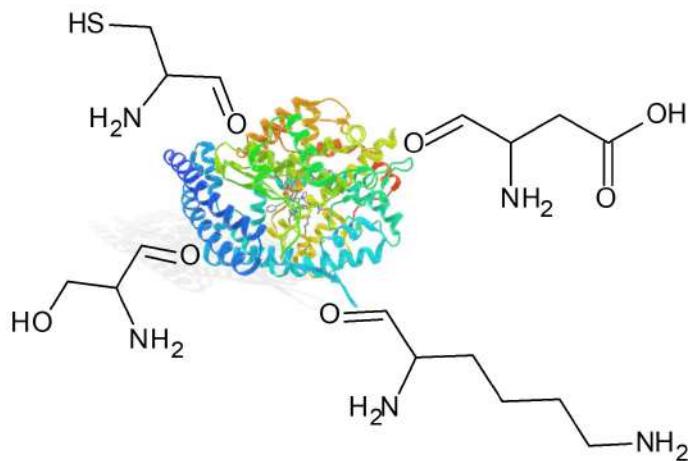


Figura 2.1: Resíduos de aminoácidos presentes na estrutura molecular enzimática da lipase CAL B (Desenho adaptado de [1]).

A ligação covalente pode manter a enzima ligada ao suporte de forma rígida, devido à força que conecta a enzima e o suporte, muitas vezes envolvendo vários grupamentos da enzima. Com a alta estabilidade desse biocatalisador, problemas como desnaturação por calor, solvente orgânicos ou pH são evitados. A grande desvantagem é o fato de que essa rigidez pode provocar mudanças na conformação da enzima, fazendo com que esta reduza sua atividade catalítica ou tenha uma parcial inativação.

A fim de aumentar o contato da enzima com o meio reacional, moléculas espaçadoras são frequentemente empregadas. O glutaraldeído é um espaçador bastante utilizado para introduzir grupos carbonilas na superfície do suporte que podem reagir com os nucleófilos das enzimas [59]. Nesse sentido, VESCOVI *et al.* [60] reportaram que o uso do glutaraldeído como espaçador garantiu o revestimento da superfície de sílica, deixando-a mais hidrofóbica. Os autores conseguiram depois disso realizar a imobilização de enzimas nos suportes heterofuncionais com apenas uma etapa do processo. Além disso, a estabilidade enzimática foi aumentada, quando comparada com outros biocatalisadores preparados sem o espaçador.

2.1.3 Interação enzima/suporte

Embora não haja um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, é necessário buscar a melhor relação suporte/enzima, bem como métodos de imobilização eficientes para determinada finalidade. Algumas características devem ser levadas em conta ao se estudar interações enzima/suporte. Em relação à enzima, podem ser consideradas pelos menos três características fundamentais. A primeira delas é o tipo de interação que será estabelecida que depende dos grupos funcionais que estarão na superfície da enzima. A segunda é o tamanho da proteína. A terceira é a faixa de pH de atuação da enzima considerada. Com relação aos suportes, destaca-se a estabilidade química, pois faz-se necessário o uso de um material que seja insolúvel no meio. Além disso, devem ser considerados o grau de hidrofobicidade e os grupos reativos presentes na superfície dos suportes [7], [14].

A insolubilidade do suporte no meio reacional constitui um fator muito importante, pois evita a contaminação do meio e a possível perda da enzima. Além disso, permite o reuso dessas enzimas imobilizadas, tornando o processo menos caro e compensador em comparação com o uso da enzima livre [5]. Características como essas podem ser adquiridas com o uso de agentes de reticulação, que melhoram sua capacidade de reuso e a insolubilidade do suporte [61], [62].

O grau de hidrofobicidade do suporte é fator que afeta diretamente a força e afinidade de interação das enzimas e suportes. Como comentado anteriormente sobre a ativação interfacial das lipases, muitos trabalhos exploram a utilização de

suportes hidrofóbicos [7], [63]. Apesar disso, vários estudos também revelam que pode não haver uma relação direta entre a hidrofobicidade e o desempenho dos biocatalisadores [22], [64]. A Figura 2.2 apresenta de forma esquemática algumas características que devem ser consideradas em relação à enzima e ao suporte para uma imobilização enzimática.

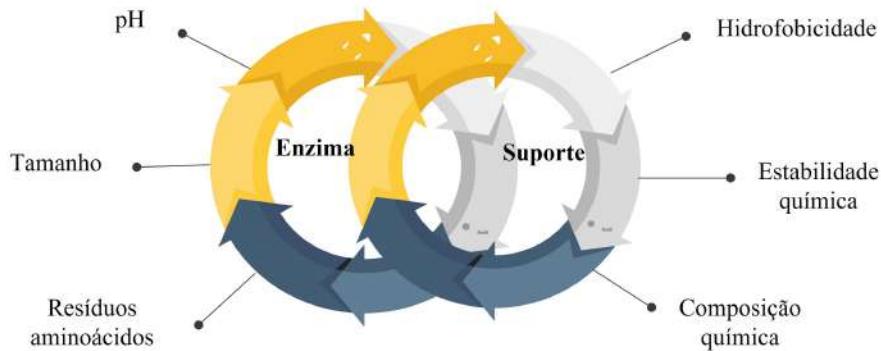


Figura 2.2: Características importantes enzima e suporte que devem ser considerados para que sejam usados em imobilizações enzimáticas.

A porosidade é um outro fator muito importante a ser levado em conta na imobilização. Suportes porosos apresentam alta área específica; no entanto, a depender do tamanho de poro, podem haver problemas difusionais, forçando o rearranjo da enzima e causando a inativação [49]. Por outro lado, os suportes os isentos de porosidade não apresentam restrições difusionais, pois a interação entre enzima e substrato é facilitada porque esta se encontra mais em contato direto com o meio reacional. Contudo, estes suportes apresentam baixa capacidade de carga e são suscetíveis a dessorção das enzimas quando imobilizados por adsorção física. [7].

MILETIĆ *et al.* [65] estudaram a síntese de suportes macroporosos de polimetacrilato de glicilia-co-dimetacrilato de etileno glicol P(GMA-co-EDGMA) em imobilizações com a CAL B. Para isto, os autores variaram o tamanho de partícula, área específica e tamanho de poro. Nos ensaios de atividade hidrolítica, os autores observaram uma forte tendência de aumento das atividades, à medida que o tamanho de poro e área específica eram aumentados. Os autores atribuíram isso à maior facilidade encontrada pelo substrato *p*-nitrofenil acetato para difundir até a enzima. Além disto, avaliaram a capacidade de carga em que uma maior quantidade de enzimas era adsorvida nas partículas que possuíam poros mais largos.

De forma geral, suportes podem ser compostos por materiais orgânicos e inorgânicos. Os suportes orgânicos usualmente são constituídos por polímeros naturais (celulose, alginato e biopolímeros) e sintéticos (polipropileno, poliestireno, PMMA) que podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos. Os suportes poliméricos naturais são baratos, mais abundantes quase sempre biodegradáveis, reduzindo possíveis contaminação do meio ambiente. A grande desvantagem do uso desses materiais é

a baixa resistência a variações de temperatura e ao ataque microbiano [66].

Dentre os diferentes suportes poliméricos sintéticos, destacam-se polipropileno, poliestireno, poliacrilatos e copolímeros de estireno com divinilbezeno. Esses suportes apresentam boa resistência a ataque microbiano e podem ser sintetizados para finalidades específicas. No mercado, eles podem ser encontrados com uma enorme gama de propriedades, podendo apresentar grupamentos ácidos e básicos que afetam grau de hidrofobicidade [7], [20].

Dentro da classe dos polímeros naturais destacam-se a celulose e o amido, materiais encontrados abundantemente na natureza. Devido à formação de ligações inter- e intramoleculares, a celulose é insolúvel na maioria dos solventes. O amido é também um biopolímero de baixo custo e biodegradável. O amido é constituído essencialmente por uma mistura dos polissacarídeos amilose e amilopectina [24].

No geral, a escolha do material usado como suporte tem o objetivo de permitir a maximização do contato entre a enzima e o suporte. Por outro lado, a estrutura molecular da enzima, os grupos funcionais que constituem a superfície do suporte e a influência das condições do meio reacional constituem características de fundamental importância não só para a escolha do suporte, mas também do melhor método de imobilização a ser empregado.

2.1.4 Aplicação de lipases imobilizadas

O uso de lipases para fabricação de biocatalisadores imobilizados nos ambientes industriais já é bastante difundido. Por exemplo, as lipases fúngicas constituem um dos grupos mais explorados no setor biotecnológico devido à sua versatilidade de suas propriedades. Esses grupos de lipases fúngicas têm sido aplicados na catálise hidrolítica de ésteres e nas reações de esterificação e transesterificação. Por esse motivo, essas enzimas encontram aplicações em diversos campos industriais, como nos setores energético, alimentício e de saúde [67], [68].

Grande parte dos compostos aromatizantes são de origem vegetal ou animal estes são responsáveis em conferir sabor e aroma aos produtos em geral, devido à origem natural desses compostos torna-se difícil isolar a partir de sua fonte de origem. Com isto, umas das rotas que têm sido aplicadas para a síntese de ésteres com aromas e sabores é a rota enzimática com o uso de lipases imobilizadas [69]. ZHAO *et al.* [70] imobilizaram a lipase *Bacillus licheniformis* em um suporte que tinha como base nanopartículas magnéticas Fe₃O₄ - quitosana. Os biocatalisadores desenvolvidos ainda adquiriram maiores pH e estabilidade térmica em comparação com a enzima livre.

As pesquisas voltadas para a síntese de compostos como ácido mandélico amplamente utilizado na industria farmacêutica e alimentícia [71]. Além disto, as lipases

imobilizadas podem ser aplicadas em rotas para a produção de biolubrificantes [72].

Um dos setores que mais se destaca no desenvolvimento de aplicações da rota enzimática é o da agroenergia, mais especificamente o setor de produção de biodiesel. Nesse setor, embora a via mais utilizada ainda seja a rota química, o uso de catalisadores químicos gera problemas relacionados à produção de resíduos, à produção de sabão, à necessidade de usar maiores temperaturas reacionais e à corrosão de reatores e linha de processo. Por isso, há a necessidade de desenvolver um sistema verde por uma via econômica, o que constitui um desafio para a produção de biodiesel [73], [74] .

Com base nessas demandas no setor agroenergético, cada vez mais pesquisas têm sido voltadas para o uso de enzimas imobilizadas para a produção de biodiesel [75], [76], [77]. Além disso, estudos mostram a viabilidade econômica em utilizar enzimas imobilizadas podendo estas serem reutilizadas 300 vezes em um processo de produção de biodiesel [78]. DE MELLO *et al.* [73] comparando os resultados para a obtenção de biodiesel por rotas alcalinas e enzimáticas, os dados indicaram que a rota enzimática apresentou uma menor consumo de água, menor geração de resíduos e melhor incorporação dos reagentes nos produtos.

No Brasil, mais precisamente em 2013, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (EMBRAPA) deu inicio a um projeto voltado para a produção de biodiesel por rota enzimática com o uso de dendê como matéria-prima. Em Israel, a multinacional Transbiodiesel já conta com a produção de biodiesel usando enzimas imobilizadas [79]. Todos estes estudos demonstraram o interesse do uso de lipases imobilizadas nos mais diversos setores da industria.

2.2 Materiais e métodos

Como fundamentado nessa breve revisão da literatura inúmeros fatores podem influenciar na eficiência de um biocatalisador. Dentre esses fatores muito tem sido explorado a respeito do uso de suportes hidrofóbicos para imobilizações. Alguns autores inferem que as lipases apresentem uma predisposição por suporte hidrofóbicos devido à presença de uma tampa hidrofóbica que protege seu sítio ativo [32],[36]. Em contrapartida, pouco tem sido averiguado a respeito do uso de suportes hidrofílicos e suas implicações para a imobilização. Por isso, há a necessidade de um estudo que avalie o efeito da hidrofobicidade de diversos materiais sobre a imobilização com a lipase de *Candida antarctica* do tipo B. O esquema na Figura 2.3 apresenta em particular os grupos de suportes utilizados no presente trabalho e como foram divididos em categorias.



Figura 2.3: Definição dos grupos de suportes usados no presente trabalho .

2.2.1 Enzima

A enzima utilizada neste trabalho foi a Lipozyme® CALB, a lipase B de *Candida Antarctica* no estado solúvel fornecido pela empresa *Novozymes*.

2.2.2 Suportes do grupo 1

O primeiro grupo de suportes (cedidos pelo Laboratório de Engenharia de Polimerização) é apresentado na Tabela 2.1. Esse grupo inclui apenas materiais com baixa área específica, de maneira que estão sujeitos a uma baixa influência da porosidade. Neste caso, a propriedade que exerce maior influência sobre o processo de imobilização é a composição do suporte, definida aqui como função do grau de hidrofobicidade que acompanha cada matriz polimérica. Esses materiais foram sintetizados pela técnica de polimerização em suspensão, que gera partículas micrométricas com áreas superficiais menores que $1 \text{ m}^2/\text{g}$ [61],[80]. Além disto, é a primeira vez que este grupo de materiais são selecionados para serem aplicados como suportes para a imobilização de enzimas.

Tabela 2.1: Lista dos suportes do grupo 1 (baixa área específica) utilizados nos ensaios de imobilização da lipase CAL B.

Sigla	Suportes Selecionados	Descrição	Referência
NL-12	Amido	Polímero de amido	-
LC37	P(MMA-co-cardanol)	Poli(metacrilato de metila-co-cardanol) 10 % m/m cardanol	[80]
NCC	PMMA_nanocelulose	Poli(metacrilato de metila) contendo nanocelulose (forma de cristais)	-
NCF	PMMA_nanocelulose	Poli(metacrilato de metila) contendo nanocelulose (forma de fibras)	-
PDEAEMA	P(MMA-co-DEAEMA)60-40	Poli(metacrilato de 2-(dietilamino) etila)40 % DEAEMA m/m	[81]
PDMAEMA	P(MMA-co-DMAEMA)60-40	Poli(metacrilato de 2-(dimetilamino)etila) 40 % m/m DMAEMA	[81]
PGA	PGA	Poli(ácido glicólico)	-
PES	PES	Poli(succinato de etileno)	[82]
R65	PS	Poliestireno	[83]
D01	P(S-co-DVB-co-GMA)25 % DVB	Poli(estireno-co-divinilbenzeno-co-metacrilato de glicidila) 25 % DVB m/m	[61]
PBS	PBS	Poli(succinato de butileno)	[84]
R06	PP	Polipropileno contendo uma casca de poliacetato de vinila	-
R12	PP/PS	Poli(propileno-co-estireno)20 % de estireno m/m contendo casca de PAN	-
R16	PP/PS	Poli(propileno-co-estireno)20 % de estireno m/m contendo casca de PAN	-

2.2.3 Suportes do grupo 2

O segundo grupo, constituído na Tabela 2.2, é composto por suportes comerciais usados como referência de polímeros disponíveis no mercado. Estes suportes foram caracterizados também quanto à porosidade, a fim de analisar como este novo fator poderia afetar a operação de imobilização. Assim, a partir dos resultados obtidos deste estudo preliminar, foi formada uma base para avaliar o tipo de composição que os nanosuportes heterofuncionais deveriam apresentar para permitir uma melhor funcionalização. Para a melhor compreensão desse estudo, as estruturas químicas dos monômeros utilizados estão descritas no Apêndice A.

Tabela 2.2: Lista dos suportes do grupo 2 (comerciais) utilizado na imobilização da lipase CAL B.

Suportes selecionados	Descrição	Fornecedores (*)
Accurel	Polipropileno comercial	AkzoNobel
Octadecil	Cadeia polimérica comercial	Mitsubishi Chemical
Poly 2	Poliolefina alifática contendo cloro	Solvay
Poly 5	Poliaromático contendo cloro	Solvay
Poly 6	Poliaromático sulfonado	Solvay
Poly 7	Poliaromático oxigenado	Solvay

*Os materiais foram fornecidos sob sigilo.

2.2.4 Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados para conduzir os ensaios de imobilização (todos os reagentes foram fornecidos na forma de grau analítico e usados como recebidos) foram:

- **Acetona** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Synth;
- **Acetonitrila** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Sigma-Aldrich;
- **Ácido oléico** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Synth;
- **Dimetilsulfóxido** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Sigma-Aldrich;
- **Etanol** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Synth;
- **Fosfato de sódio monobásico** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Synth;
- **Hidróxido de sódio** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Vetec Química Final;
- **p-nitrofenil laurato** - pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Sigma-Aldrich.

2.2.5 Equipamentos utilizados nos ensaios de imobilização e nas reações dos biocatalisadores

Segue a descrição dos equipamentos utilizados na imobilização dos suportes, nas reações de hidrólise e esterificação e na caracterização do grau de hidrofobicidade.

- **Espectrofotômetro** - modelo UV-1800, empresa Shimadzu.
- **Banho de aquecimento** - modelo 521-2D, empresa Etica;
- **Titulador automático** - modelo G-20, Mettler Toledo.
- **Tensiômetro de força** - modelo K100, empresa KRÜSS Scientific.

2.2.6 Grau de hidrofobicidade

Quando um líquido entra em contato com uma superfície, ele tende a se espalhar ou formar uma gota. O ângulo do líquido e a superfície de um sólido é denominada de ângulo de contato. Vale ressaltar que a molhabilidade de um sólido por um líquido pode ser descrita como o somatório das tensões que atuam sobre o sistema que pode ser expresso pelo ângulo de contato θ . A Equação 2.1 de Young pode ser usada para o cálculo do ângulo de contato θ [85],

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos\theta_Y \quad (2.1)$$

sendo:

γ_{sv} - tensão superficial do sólido;

γ_{sl} - tensão interfacial entre o sólido e o líquido;

γ_{lv} - tensão superficial do líquido.

A formação do ângulo de contato está relacionada com as forças moleculares encontradas na superfície. Em líquidos, as forças superficiais se encontram em desequilíbrio, quando comparadas com as forças internas que estão em equilíbrio. Assim, acumula-se energia na interface em relação ao centro. A fim de minimizar a energia da superfície, o líquido tende a se contrair e tornar-se côncavo quando entra em contato com uma superfície.

As medições dos ângulos de contato foram realizadas para a obtenção do grau de hidrofobicidade dos suportes. Para isto, pastilhas foram produzidas com cada material com auxílio de uma prensa e depois os suportes foram conduzidos ao tensiômetro.

O experimento consistia em prender a pastilha em uma garra alocada no equipamento. Além disso, algumas informações foram adicionadas ao software do equipamento *Kruss Process* modelo K100, como diâmetro e espessura das pastilhas.

Depois o material era parcialmente imerso em um recipiente contendo água destilada, sendo fornecido o valor do ângulo de contato para cada tipo de suporte, como função da diferença entre avanço e recuo do ângulo de contato [85]. O procedimento foi realizado em duplicata. Por meio dos ângulos de contato obtidos para cada material foi possível indicar os suportes que possuíam maior ou menor caráter hidrofóbico. A Figura 2.4 apresenta o tensiômetro equipamento utilizado na medição do ângulo de contato.



Figura 2.4: Tensiômetro utilizado para a medição do ângulo de contato.

2.2.7 Processo de imobilização por adsorção física

A metodologia aplicada para imobilização da lipase foi a adsorção física e seguiu o protocolo proposto por PINTO *et al.* [61] e PINTO *et al.* [86] e como descrito a seguir.

Os suportes foram colocados em tubos do tipo falcon e hidratados com 20 mL de álcool 70°. A hidratação foi usada para que o ar contido nos poros fosse expulso, deixando o poro livre para o acoplamento da enzima.

Após essa etapa, a CAL B foi imobilizada. Para isso foi utilizado um tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7. Por fim, o contato entre a enzima e o suporte foi conduzido sob agitação em torno de 36 rpm por 24 h. Com a finalidade de acompanhar a curva de imobilização, durante o processo alíquotas de 150 µL foram retiradas do sobrenadante nos intervalos 0, 30 min, 1, 2, 4 e 24 h.

Ao término das imobilizações, os biocatalisadores foram filtrados e lavados com tampão (5 mM e pH 7), garantindo assim o pH neutro do meio. Concluída a lavagem, os biocatalisadores foram condicionados na geladeira (18 °C) para posterior avaliação

de desempenho nas reações de hidrólise e esterificação.

2.2.8 Curva cinética de imobilização

A construção da cinética de imobilização foi baseada na medida da atividade enzimática do sobrenadante ao longo das 24 h. Foi tomada como referência a reação hidrolítica entre a enzima e o substrato *p*-nitrofenila (*p*-PNL) laurato incolor, sendo possível avaliar o quanto cada suporte adsorveu de enzima.

As análises foram acompanhadas no espectrofotômetro da empresa Shimadzu, modelo UV-1800. A atividade hidrolítica foi medida, pela mudança de coloração do substrato que, após a ação catalítica da lipase, origina um produto de cor amarelada que pode ser quantificado mediante a absorção no comprimento de onda λ de 412 nm. O aumento da concentração do produto formado em minutos foi observado pela intensidade de absorção nesta região por volume de solução enzimática, revelando a velocidade de reação enzimática segundo a Lei de Lambert - Beer [87].

Em uma cubeta de vidro foram adicionados 2,2 mL de tampão fosfato de sódio (25 mM e pH 7) e 0,25 mL de substrato. Em seguida, inseria-se a cubeta no espectrofotômetro em que era feita leitura de absorção. Com a formação da linha de base da leitura adicionou-se 20 μ L do sobrenadante. Para o cálculo de atividade hidrolítica do sobrenadante foi utilizada Equação 2.2 PINTO *et al.* [86],

$$A_{hidro} = \frac{\alpha V_f f}{V_e} \quad (2.2)$$

na qual:

A_{hidro} : atividade hidrolítica (UI/mL);

α : corresponde ao coeficiente angular da reta observada experimentalmente (absorbância/min);

V_f : volume final do meio reacional (mL);

f : fator de correlação obtido pela curva de calibração do *p*-nitrofenol em tampão fosfato de 25 mM a 30°C;

V_e : volume de sobrenadante (enzima) adicionado ao meio reacional (mL).

Ao final, foi possível obter a atividade hidrolítica (UI/mL) em (UI/g *suporte*), pois o valor em (UI/mL) foi multiplicado por um fator conversão igual a 10 e dividido pela massa do suporte. Nesse valor está incluída a quantidade necessária de enzima para catalisar a formação de 1,0 μ mol de produto por minuto. A Figura 2.5 apresenta o esquema do protocolo de imobilização enzimática até o momento da leitura no espectrofotômetro o que gerou a curva cinética de imobilização.

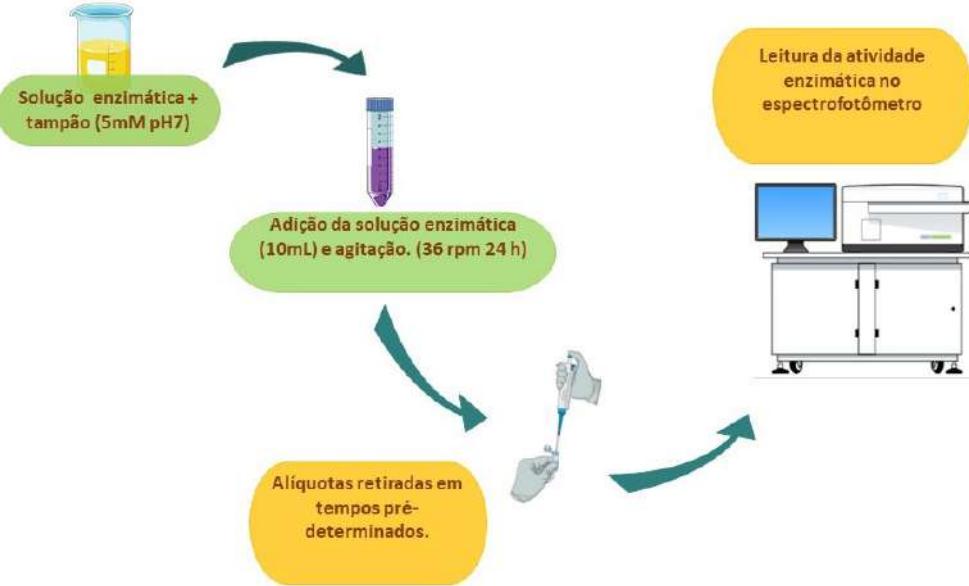


Figura 2.5: Esquema do protocolo estabelecido para a construção da curva de imobilização.

2.2.9 Rendimento

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado como a diferença entre a atividade hidrolítica da solução enzimática antes da imobilização (A_i) e a atividade hidrolítica após o processo de imobilização (A_f). A Equação 2.3 apresenta o valor de RI, dado com uma porcentagem do valor original de atividade (A_i),

$$R_{imob}(\%) = \frac{A_i - A_f}{A_i} 100 \quad (2.3)$$

sendo:

A_i é a atividade enzimática da solução no início da imobilização (UI/g);

A_f é atividade verificada após as 24 h de imobilização.

2.2.10 Reação de hidrólise

A reação hidrolítica foi conduzida de forma similar à do procedimento realizado anteriormente para a enzima solúvel PINTO *et al.* [61] e PINTO *et al.* [86]. Para tal, numa cubeta de vidro foram adicionados 2,2 mL de tampão fosfato sódico (25 mM pH 7) e 0,25 mL do substrato *p*-nitrofenila foram conduzidos ao espectrofotômetro. Ao iniciar a leitura no equipamento, foram adicionados 0,01 g de biocatalisadores (enzima já imobilizada) à cubeta. A leitura foi feita por 8 min e a cubeta foi agitada a cada 10 segundos para que homogeneização do meio fosse feita. A Equação 2.4 apresenta o cálculo de atividade para a reação de hidrólise para a enzima imobilizada no suporte (A_{hidro}) (UI/g),

$$A_{hidro} = \frac{\alpha V_f f}{M_b} \quad (2.4)$$

sendo:

- α : corresponde ao coeficiente angular da curva experimental (absorbância/min);
- V_f : volume final do meio reacional (mL);
- f : fator de correlação obtido pela curva de calibração do p-NPL em tampão 25 mM a 30 °C;
- M_b : massa de biocatalisador (g).

2.2.11 Reação de esterificação

A atividade de esterificação foi feita com base na quantificação da reação de ácido oleico (4,5 mL) e de etanol (0,83 mL) (1 mol : 1 mol) com adição de 0,2 g de biocatalisadores PINTO *et al.* [61] e PINTO *et al.* [86]. As reações foram conduzidas em frascos de vidro devidamente fechados e aquecidos numa placa a 45 °C e mantidos a uma agitação de 258 rpm por 24 h. Para a coleta dos dados, alíquotas de 250 µL foram retiradas do meio reacional nos intervalos de 0 min, 30 min, 45 min, 1 h e 24 h. Essas alíquotas foram adicionadas em copos e as leituras foram realizadas em duplicatas.

Para a realização da leitura, eram vertidos 40 mL de acetona e etanol (1:1 (v/v)) na alíquota, para paralisar a reação e extrair o resíduo de ácido presente no meio reacional. A determinação da quantidade de ácido que era consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,08 M até o meio atingir um pH 11. A quantidade de enzima que promove a geração de 1 µmol de oleato de etila por minuto é definida como atividade de esterificação A_{ester} mensurada em (1 UI/g), conforme a Equação 2.5,

$$A_{ester} = \frac{1000(V_{NaOH0} - V_{NaOHt})C_{NaOH}V_f}{V_e t M_e} \quad (2.5)$$

na qual, tem-se a atividade enzimática de 1 g de biocatalisador;

$V_{(NaOH0)}$: é o volume de hidróxido de sódio (NaOH) gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL);

$V_{(NaOHt)}$: é o volume de hidróxido de sódio (NaOH) gasto na titulação das amostras nos tempos t (mL);

$C_{(NaOH)}$: molaridade da solução de NaOH (mol/L);

V_f : volume final do meio reacional (mL);

V_e : volume de alíquota retirada do meio reacional para titulação (mL);

t : tempo (min);

M_e : massa de biocatalisador usado na reação (g).

2.3 Resultados e discussões

2.3.1 Análises para os suportes com baixa área específica

A Tabela 2.3 apresenta a área específica, rendimento de imobilização, grau de hidrofobicidade e os resultados das atividades de hidrólise e esterificação para cada suporte. Os materiais apresentam hidrofobicidades variadas, incluindo desde os mais hidrofílicos 46°(LC37) até os mais hidrofóbicos 96° (R65). Como comentado anteriormente, esses materiais foram produzidos por polimerização em suspensão para garantir que todos tivessem baixa área específica. Além disso, para todos os suportes foram construídas curvas cinéticas de adsorção por meio das quais foi possível avaliar os rendimentos ao final da imobilização, bem como a cinética de imobilização.

É possível notar que o suporte com maior caráter hidrofóbico, o suporte R65, resultou no maior rendimento de imobilização de 98%, enquanto o mais hidrofílico, o suporte LC37, resultou no menor rendimento (5%). Estes dados concordam com o fato de que a lipase teria maior predisposição em expor seus sitio ativo para superfícies hidrofóbicas [30], [31]. Entretanto, para os suportes com grau de hidrofobicidade intermediário, não foi observado correlação expressiva dessa variável com o rendimento de imobilização. Por exemplo, os materiais P(MMA-co-DMAEMA), R06, R12, que apresentam caráter hidrofóbico, resultaram em rendimentos de imobilização relativamente baixos. Em contrapartida, os suportes PES e NL-12 (hidrofílicos) apresentaram valores altos de rendimento de imobilização, que chegaram a 78%.

Tabela 2.3: Parâmetros obtidos para os biocatalisadores com baixa área específica com carga enzimática inicial de 200 U/g (A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, A_{hidro} = atividade de hidrólise e A_{ester} = atividade de esterificação).

Sigla	A_{esp} (m ² /g)	R_{imob} (%)	G_{hidro} (°)	A_{hidro} (U/gbio)	A_{ester} (U/gbio)
NL-12	0	35	56	12	160
LC37	0	5	46	14	31
NCC	0	2	49	4	21
NCF	0	1	62	12	38
P(MMA-co-DEAEMA)60-40	0	51	63	13	296
P(MMA-co-DMAEMA)60-40	0	7	62	6	57
PGA	0	34	*	5	11
PES	0	78	50	4	19
R65	0,7	98	96	1	268
D01	0,0025	8	*	16	–
PBS	0	90	64	10	201
R06	0	26	73	5	–
R12	0,24	13	*	9	47
R16	0	3	82	15	200

*Os materiais não formaram pastilhas, impossibilitando a análise

–Não foi possível realizar a análise para essas amostras.

As Figuras 2.6, 2.7 e 2.8 apresentam as cinéticas de imobilização dos suportes por um período de 24 horas. Estas curvas foram construídas admitindo que a atividade oferecida no ponto inicial (tempo zero) era de 100 %. A Figura 2.6 representa os suportes mais hidrofílicos, que no início levaram a rendimento entre 60 e 80 %, o que pode estar associado à afinidade das lipases com o meio aquoso. Contudo, ao longo do processo de imobilização, podem ocorrer mudanças neste cenário, pois uma certa quantidade de enzima pode ser dessorvida, indicando que as forças de atração exercidas entre o suporte e a lipase não foram suficientes para manter a enzima imobilizada.

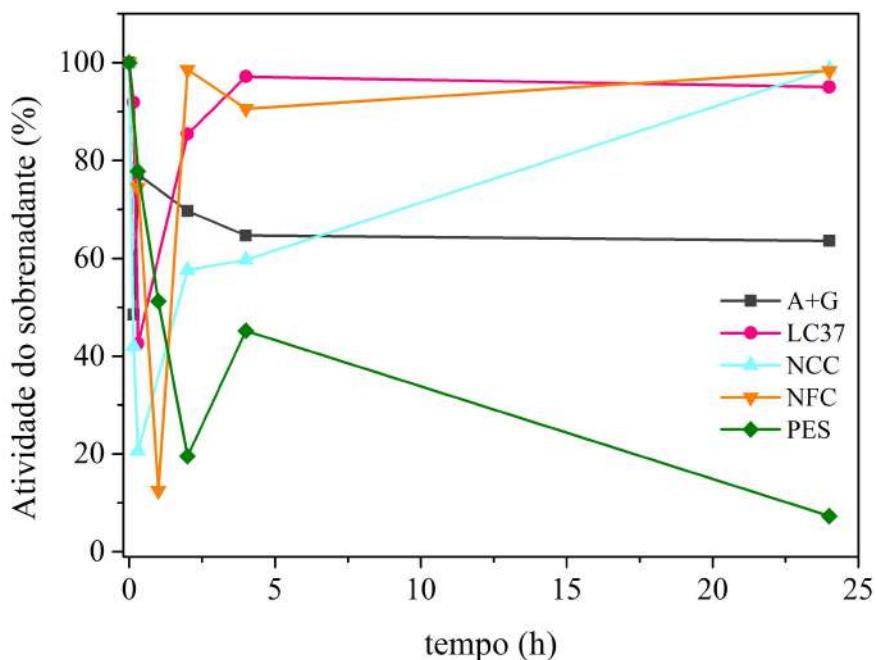


Figura 2.6: Cinéticas de imobilização da lipase avaliadas com os suportes hidrofílicos (Polímero de amido, P(MMA-*co*-cardanol, PMMA_nanocelulose - cristais, PMMA_nanocelulose - fibras e Poli(succinato de etileno).

A Figura 2.7 apresenta um segundo grupo de suportes, desta vez com caráter mais hidrofóbico. Dois desses suportes, o DEAEAMA e o PGA, levaram um processo de imobilização mais lento. Por outro lado, o suporte mais hidrofóbico (R65) levou a uma rápida cinética de imobilização, chegando a 98% de rendimento em menos de 1 hora e mantendo-se constante até o fim do processo. Isso pode ser explicado pela forte atração hidrofóbica exercida por este suporte, que foi capaz de manter a enzima adsorvida na superfície. Por fim, os suportes DO1 e DMAEAMA apresentaram um desempenho insatisfatório, pois no caso do DMAEAMA o rendimento de imobilização foi de apenas 7 %, enquanto no caso do DO1 o rendimento da imobilização foi igual a 8 % no final do processo.

A Figura 2.8 apresenta o último grupo de suportes, que apresentaram curvas

cinéticas lentas e sem expressão no rendimento de imobilização, com exceção feita para o PBS, que atingiu 90% de rendimento de imobilização.

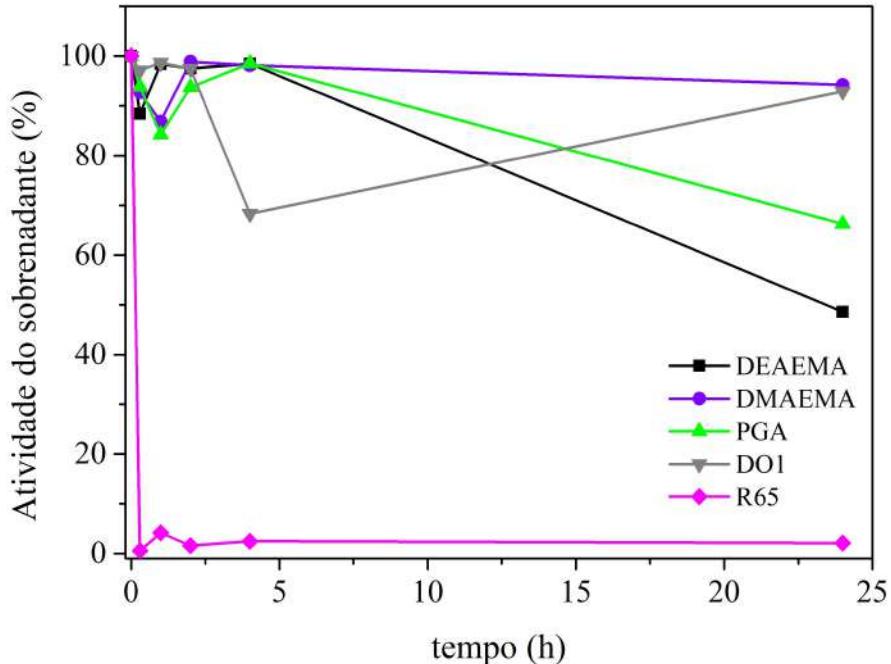


Figura 2.7: Cinéticas de imobilização da lipase avaliados com os suportes hidrofóbicos (PDEAEMA, PDMAEMA, Poli(ácido glicólico), P(S-*co*-DVB-*co*-GMA), Poliestireno).

As curvas cinéticas da maioria dos suportes apresentaram efeitos de adsorção e dessorção das enzimas ao passo que a imobilização acontecia, como também foi observado na literatura por PINTO *et al.* [61] e PINTO *et al.* [86]. Esses autores trabalharam tanto com suportes porosos quanto não porosos e salientaram que essas flutuações foram observadas principalmente para o segundo grupo. Possivelmente, isto pode estar atrelado às baixas áreas específicas dos suportes em que as enzimas e à ausência de proteção dos poros, ficando suscetíveis a fatores externos: fenômenos de superfície, a mudanças de pH e temperatura. Ademais, essas enzimas são ligadas por forças fracas do tipo Van der Walls que tornam o processo de dessorção mais fácil e o processo de adsorção reversível mais suscetível à influência do meio.

A Tabela 2.3 apresenta o desempenho dos biocatalisadores nas reações de hidrólise e esterificação. Além disso, para melhor analisar a influência do grau de hidrofobicidade sobre o desempenho dos biocatalisadores, a Figura 2.9 apresenta gráficos das atividades de hidrólise e esterificação como função do grau de hidrofobicidade de cada suporte.

Analizando a Figura 2.9, observa-se que tanto a atividade de hidrólise quanto esterificação apresentam relação não trivial com o grau de hidrofobicidade, em contraponto com as discussões comumente apresentados na literatura, que atestam que

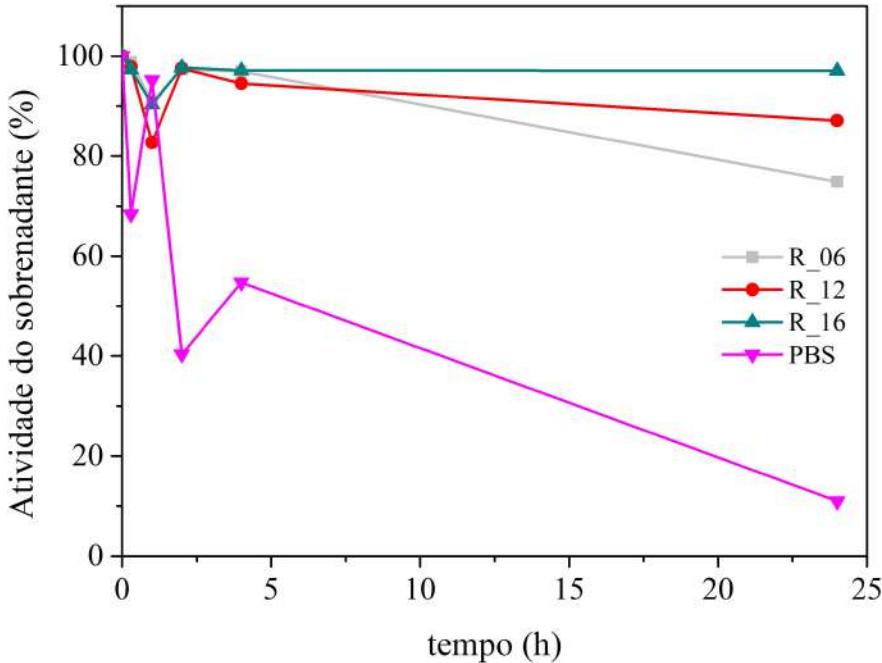


Figura 2.8: Cinéticas de imobilização da lipase avaliadas para os suportes PP, PP/PS e Poli(butileno succinato).

o desempenho do biocatalisador aumenta como função do grau de hidrofobicidade. Nesse mesmo contexto, PINTO *et al.* [63] estudaram os desempenhos de suportes funcionalizados extremamente hidrofóbicos em imobilizações com lipase CAL B e esses autores também não observaram a existência de uma relação direta entre o grau de hidrofobicidade dos suportes e o desempenho dos biocatalisadores. Por exemplo, nesse trabalho os autores relataram que os suportes hidrofílicos permitem obter um melhor desempenho nas atividades hidrolíticas que os suportes hidrofóbicos.

A respeito da ativação interfacial da enzima, JIN *et al.* [88] estudaram a imobilização das lipases *Pseudomonas cepacia* (PCL) e CALB em suportes mesoporosos de sílica com superfícies funcionalizadas hidrofóbicas e hidrofílicas, observando que as imobilizações realizadas com a PCL ocorreram por intermédio da ativação interfacial, de modo que foram obtidas maiores atividades para os suportes mais hidrofóbicos. Em contrapartida, ao conduzirem esse ensaio para a CAL B, esse padrão não foi repetido, dando indícios de que o desempenho da CAL B, pode não ser tão dependente de uma superfície hidrofóbica. Isto pode estar relacionado com o fato de que a CAL B possui um canal estreito que dá acesso ao sítio ativo e que este canal pode não estar protegido por uma tampa, não estando sujeita dessa forma à ativação interfacial [36],[46].

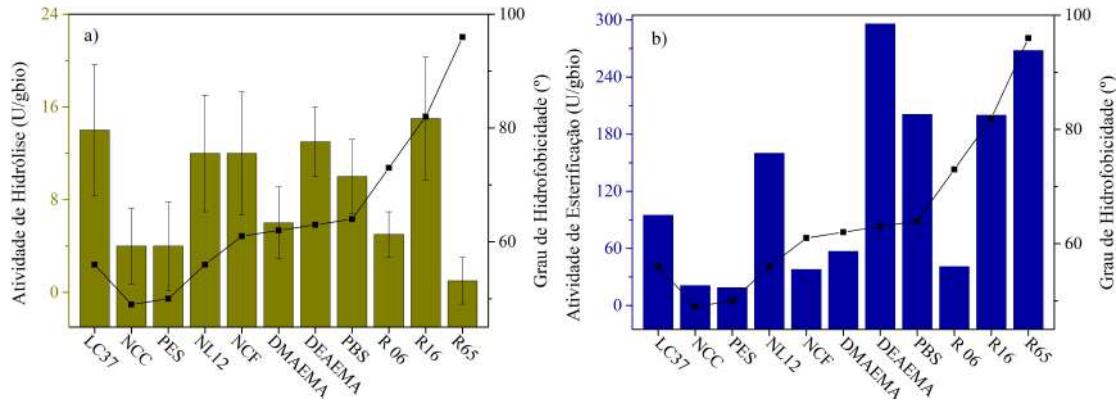


Figura 2.9: Influência do grau de hidrofobicidade. a) atividade de hidrólise e b) atividade de esterificação dos biocatalisadores.

2.3.2 Análises para os suportes comerciais com diferentes áreas específicas

Nessa seção foram estudados suportes comerciais com baixa área específica e comerciais com áreas específicas elevadas. Uma característica desses materiais que deve ser destacada é o grau de hidrofobicidade mais acentuado do que o grupo anterior. Dessa forma, foi possível avaliar o efeito conjunto da porosidade e do grau de hidrofobicidade.

A Tabela 2.4 mostra as características dos materiais que formam esse grupo de suportes. Conforme a tabela, os graus de hidrofobicidade dos materiais são próximos, sendo que apenas o suporte Poly 2 apresentou grau de hidrofobicidade consideravelmente menor dos demais. Já os rendimentos de imobilização mostraram que os suportes com baixa área específica (Poly 2 e Poly 7) levaram a baixos rendimentos de imobilização, sendo possível inferir que somente esta variável não é determinante para que haja uma boa interação entre o suporte e a lipase. Para os materiais porosos, o aumento do rendimento de imobilização foi decorrência do aumento de área, fazendo com que os suportes octadecil e Poly 7 fossem os que apresentassem maiores rendimentos. Como a CAL B não apresenta um bom desempenho para reação de hidrólise, os valores de atividade foram baixos quando comparados com a atividade de esterificação.

Como não é conhecida ao certo a natureza das composição desses materiais comerciais, não foi possível fazer uma avaliação inequívoca de como a composição pode influenciar na ligação enzima/suporte. É possível notar uma influência das áreas específicas sobre o desempenho desses biocatalisadores, possivelmente indicando que o aumento da área facilitou a difusão dos substratos até a enzima.

Referindo-se agora às cinéticas de imobilização para os suportes comerciais apresentadas na Figura 2.10, os materiais com baixa área específica levaram ao mesmo comportamento apresentado pelos suportes avaliados na seção anterior, que leva-

Tabela 2.4: Parâmetros obtidos para os suportes comerciais com carga inicial enzimática de 200 U/g. A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, A_{hidro} = atividade de hidrólise e A_{ester} = atividade de esterificação.

Sigla	A_{espec} (m ² /g)	G_{hidro} (°)	R_{imob} (%)	A_{hidro} (U/gbio)	A_{ester} (Ug/bio)
Accurel	27	95	6	20	130
Octadecil	138	*	96	6	328
Poly 2	0	70	16	6	12
Poly 5	0	90	18	8	49
Poly 6	44	93	76	4	131
Poly 7	86	95	97	19	342

*O material não ficou na forma de pastilha, impossibilitando a análise.

ram a altos valores de rendimento, em torno de 80 %, nos instantes iniciais da imobilização. Contudo, a interação enzima/suporte não se mostrou suficientemente estável, provocando o processo de dessorção. Para os suportes com alta área específica, o processo de adsorção das enzimas ocorreu de forma rápida, chegando ao fim das 24 h com praticamente toda carga de enzima adsorvida. Por exemplo, o suporte comercial Accurel (27 m²/g) apresentou esse comportamento. Corroborando estes dados, PINTO *et al.* [64], estudaram partículas casca-núcleo com áreas específicas entre 1 e 18 m²/g e observaram este mesmo efeito de dessorção nas partículas com menor área específicas.

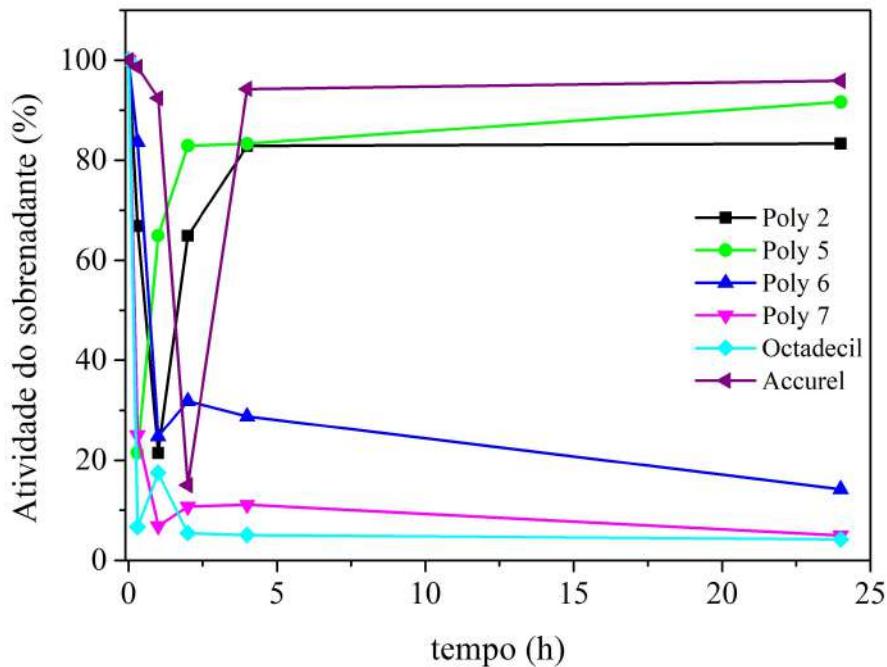


Figura 2.10: Curvas cinéticas de imobilização da lipase avaliadas com os suportes comerciais.

A Figura 2.11 apresenta as atividades de acordo com o aumento do grau de hidrofobicidade. É possível notar uma relação do aumento do grau de hidrofobicidade com o aumento das atividades de hidrólise e esterificação nas partículas. Provavelmente o grau de hidrofobicidade exerce efeito mais aparente nos suportes porosos. Mais um vez, como a composição desses suportes comerciais não é conhecida, não é possível afirmar se a relação entre o grau de hidrofobicidade e o aumento das atividades de fato a variável de maior influência, devido à importância dos grupos funcionais da superfície para explicar a interação enzima/suporte.

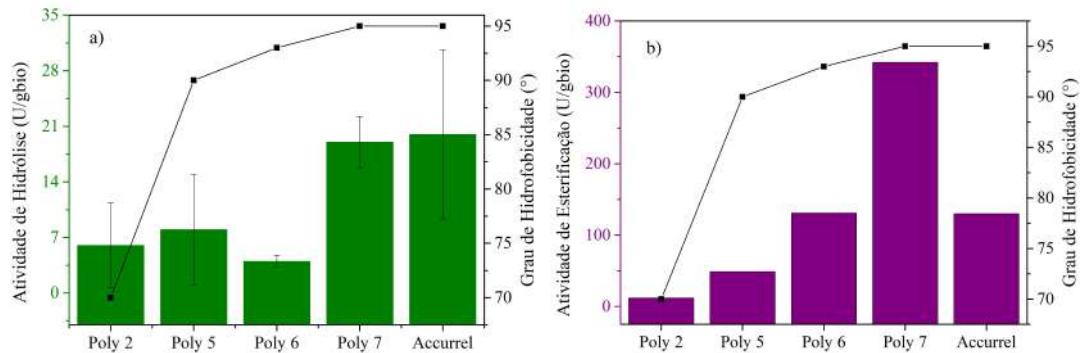


Figura 2.11: Influência do grau de hidrofobicidade de suportes comerciais no desempenho de biocatalisadores obtidos da imobilização de lipase B de *Candida antarctica*. (a) atividade de hidrolise e (b)atividade de esterificação. a) atividade de hidrólise e b) atividade de esterificação.

2.4 Considerações finais

Este capítulo apresentou um estudo preliminar conduzidos com 24 suportes em imobilizações com a lipase CAL B, incluindo materiais com alta e baixa área específica e com variados graus de hidrofobicidade. Todos tiveram seus desempenhos avaliados em termos de atividades de hidrólise e de esterificação e foi verificada a influência essencialmente positiva do grau de hidrofobicidade em todos os processos estudados.

Constatou-se em particular que materiais com baixa área específicas podem não permitir a estabilização do processo de imobilização e eventualmente causar a desorção das enzimas. Além disso, o grau de hidrofobicidade não causou de forma significativa o aumento das atividades de hidrólise e esterificação, mostrando assim que a lipase CAL B não é dependente de uma superfície hidrofóbica para gerar biocatalisadores ativos para estas condições aqui empregadas de imobilização.

Em seguida, os estudos conduzidos com materiais comerciais porosos mostraram uma relação mais clara entre o desempenho dos biocatalisadores nas atividades de hidrólise e esterificação e o grau de hidrofobicidade e área específica, embora não seja possível afirmar que a influência do grau de hidrofobicidade seja o fator determinante para a atividade do biocatalisador, já que pode haver outras variáveis envolvidas no

processo, como a porosidade, a área específica e a composição química.

Diante dos resultados obtidos, há óbvios incentivos para a preparação de suportes com áreas específicas elevadas e composições variadas, embora preferencialmente com graus de hidrofobicidade elevados, com o objetivo de maximizar simultaneamente os rendimentos de imobilização e as atividades de hidrólise e esterificação dos biocatalisadores.

Capítulo 3

Síntese de nano-suportes heterofuncionais

O presente capítulo aborda a produção de nano-suportes heterofuncionais por meio da técnica de polimerização em emulsão para serem empregados na imobilização com a lipase CAL B. Na seção 3.1 a revisão bibliográfica apresenta as vantagens na utilização de materiais em nanoescalas nas mais diversas áreas. Além disto apresenta estudos de suportes heterofuncionais utilizando o grupamento epóxido na composição de biocatalisadores e trabalhos que descrevem o processo de síntese por meio da técnica de polimerização por emulsão. Na seção 3.2 é descrito a produção dos nano-suportes poliméricos. Na seção 3.3 são discutidos os resultados obtidos por meio das análises de rendimento e conversão e caracterizações de distribuição dos tamanhos de partícula, análise de fissão, microscopia eletrônica de varredura - MEV, espectroscopia de infravermelho - FTIR, grau de hidrofobicidade destes nano-suportes. Por fim, algumas considerações foram levadas em conta baseadas nas observações dos resultados.

3.1 Revisão bibliográfica

3.1.1 Nanoestruturas

Há 150 Michael Faraday, por meio da síntese de nanopartículas de ouro, tornou-se o precursor da área de nanociência e nanotecnologia. Porém, o seu trabalho gerou alguns questionamentos no meio científico, como a respeito da relação entre o tamanho do material com as propriedades ópticas [89],[90], [91]. Contudo, o lançamento da base conceitual sobre nanotecnologia foi estabelecido somente por intermédio do físico teórico Richard Feynman em sua famosa palestra "*There's Plenty of Room at the Bottom*". Como consequência do desenvolvimento dessas atividades, a engenharia em nanoescala abriu espaço para o estudo de fenômenos e propriedades

relacionadas ao rearranjo dos átomos [92], [93].

Em uma conferência em 1974, o termo "nanotecnologia" foi apresentado pela primeira vez pelo professor Norio Taniguchi [94]. Fundamentadas no controle da matéria no nível atômico, pesquisas nessa área começaram a avançar. Por volta da década de 1980 foi desenvolvimento o Microscópio de Varredura por Tunelamento (MVT) pela International Business Machines (IBM), possibilitando que fossem observadas manipulações em escala atômica, dando assim subsídio para a criação de outros microscópios [90].

Para a manipulação e visualização de materiais em nanoescala, destacam-se as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), que permitem a observação detalhada da morfologia de partículas. Ademais, Microscópios por Varredura de Sensor (SPM) e técnicas de Microscopia de Força Atômica (MFA) podem mostrar átomos individualizados na superfície dos nanomateriais. Por fim, pode ser ainda destacado que a técnica de Microscópio de Corrente por Tunelamento (STM) pode ser usada para a visualização de amostras condutoras [90].

Dando continuidade a esses desenvolvimentos, em 1996 Kroto, Smalley e Curl ganharam o prêmio Nobel de Química pela descoberta do fulereno (C₆₀) e em 1991 o pesquisador Sumio Iijima foi o responsável pela síntese dos nanotubos de carbono [95], [96]. Assim, diante de tantos eventos, ocorreu o aumento expressivo na produção e utilização de nanomateriais, que prometiam avanços tecnológicos promissores.

Dentre as vantagens do uso de materiais em nanoescala está o fato de que a grande maioria dos átomos está disposta na superfície e não nas camadas internas, fazendo com que sejam extremamente ativos, reativos e interativos. Outra vantagem é a elevada área específica desses materiais em relação ao volume, o que intensifica os efeitos de superfície [94].

Destaca-se também a melhoria nas propriedades mecânicas desses materiais, sendo possível torná-los mais resistentes e mais leves. Além disso, também é possível aprimorar suas propriedades magnéticas e ópticas. Na área médica, os nanomateriais têm contribuído no desenvolvimento de novos compostos e com o melhoramento das técnicas de entrega dos fármacos. Como consequência, nanoestruturas como nanotubos de carbono, fulereno, partículas poliméricas e óxidos metálicos têm sido amplamente investigados na literatura. Em outro contexto, o uso dos nanomateriais tem se difundido em áreas como a catálise enzimática e química devido ao aumento da superfície de contato das nanoestruturas, em comparação com materiais característicos da escala micrométrica. [90],[94].

3.1.2 Nanopartículas poliméricas

O avanço na área de biotecnologia conduziu ao uso de materiais baseados em nanoscala para o campo de desenvolvimento de suportes. A literatura reporta o uso de nanopartículas pela primeira vez como suportes enzimáticos no final de 1980, quando enzimas foram encapsuladas em nano-grânulos poliméricos (monômeros acrilamida e N, N'-metilenobisacrilamida) [97]. Essa área de integração do uso de nano-suportes para imobilizações enzimáticas é conhecida como nano-biocatálise. Dentro desse universo, os primeiros grupos de nanomateriais que se destacaram como nano-suportes para imobilizações foram as nanopartículas de sílica, de magnetita e de ouro [98].

Os dois fatores que levaram as nanoestruturas a serem amplamente utilizadas no campo da imobilização são a alta capacidade de carga enzimática, que pode ser acomodada devido à maximização da área específica, e a redução de limitações difusoriais [99], [100]. Em função das altas áreas específicas desses materiais, mais moléculas enzimáticas podem se ligar à superfície, consequentemente aumentando os valores de atividades obtido quando as enzimas estão ligadas nanomateriais [63].

Outro fator importante é a difusão do substrato no meio reacional até o local ativo da enzima imobilizada. No trabalho de AN *et al.* [99] foi mostrado que, manipulando-se a morfologia de nanopartículas sintetizadas, é possível minimizar efeitos de transferência de massa. Por exemplo, com o uso de nanoflores, as enzimas ficaram depositadas em suas pétalas facilitando a interação com o substrato. Além disso, foi mostrada a eficiência da utilização de nanofios com poucos canais internos para a produção de biocatalisadores.

Segundo JIA *et al.* [101], quando as nanopartículas estão interligadas, a enzimas, as nanopartículas podem conferir um comportamento móvel na suspensão, na forma de movimento browniano, conferindo maior mobilidade e consequentemente melhor atividade enzimática, quando comparadas a enzimas livre. Os autores mostraram que a perda de mobilidade pode ocorrer com o aumento no tamanho da partícula e que esse pode ser um fator determinante para perdas de atividades.

A Figura 3.1 resume de forma esquemática algumas vantagens dos nano-suportes, como as várias formas que estes podem assumir, a diversidade de materiais que podem ser utilizados, a possibilidade de funcionalizar a superfície com uma gama de grupos e, obviamente, a possível manipulação do tamanho na nanoscala. Todas essas características dos nano-suportes tornam o seu uso propício em processos de imobilização.

Com amplo uso em imobilizações, os nano-suportes de sílica (SiO_2) são quimicamente e termicamente inertes e apresentam resistência microbiana. Este material é caracterizado pela possível manufatura de produtos com alta área específica e alta capacidade para funcionalização com tióis [102] e epóxidos [11]. BERNAL *et al.*

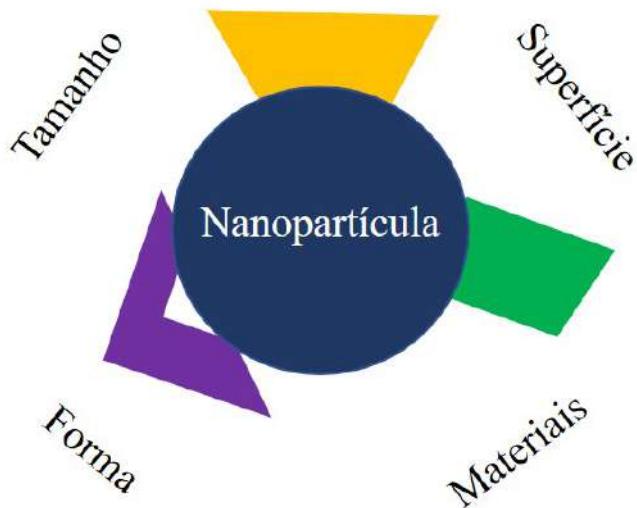


Figura 3.1: Funcionalidades características e manipuláveis de uma nanopartícula.

[103] imobilizaram as lipases *Alcaligenes sp.* e *Pseudomonas stutzeri* em suporte mesoporoso de sílica funcionalizado com 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano, trietoxioctilsilano. Os autores mostraram a versatilidade desses novos suportes por meio de comparações feitas com desempenhos de imobilizações em suportes comerciais, tendo sido possível obter melhores conversões em reações de esterificação catalisadas pelos nanobiocatalisadores.

WANG *et al.* [104] mostraram que nanoestruturados de sílica, nanotubos de carbono e nano-suportes metálicos foram úteis quando empregados no processo de tratamento de água com nanobiocatalisadores obtidos por meio da imobilização de enzimas. Foram então obtidas melhores taxas de remoção desinfecção e detecção de contaminantes por meio da preparação de sensores eletroenzimáticos. Além disso, esses materiais permitiram a imobilização de diferentes enzimas que realizavam funções distintas nos sensores usados para a detecção de contaminantes.

Dentre os vários tipos de nanopartículas, as partículas poliméricas apresentam muitas vantagens competitivas, como as boas biocompatibilidade, biodegradabilidade e facilidade de funcionalização [18], [105]. Esses materiais apresentam ainda boa resistência ao ataque de microorganismos, que encorajam o uso em aplicações biomédicas, encapsulamento enzimático, transfecção de DNA, fabricação de biosensores [12] e liberação de fármacos [13].

Nanopartículas poliméricas podem se apresentar na forma de nanoesferas, formados por uma matriz polimérica contínua, ou nanocápsulas, formadas por um núcleo oleoso e um revestimento polimérico [106]. Duas abordagens têm sido comumente utilizadas para a preparação das nanopartículas poliméricas: a abordagem

"top-down"(cominuição) e a abordagem *"bottom-up"*(síntese). A técnica top-down permite obter partículas em menores escalas partindo de partículas em escala micrométrica. Para isso, nanopartículas poliméricas devem ser obtidas a partir da fragmentação de polímeros pré-formados, enquanto que na abordagem *bottom-up* as nanopartículas serão devem ser produzidas por intermédio de reações de polimerização [106].

A obtenção das nanopartículas a partir diretamente da reação de polimerização de monômeros está baseada usualmente nos processos de polimerização como mini-emulsão, microemulsão ou emulsão, descritas posteriormente [106]. A obtenção de nanopartículas formadas a partir de polímeros pré-formados pode ser realizada com auxílio de técnicas de evaporação de solvente, diálise e nanoprecipitação [106]. O uso desses processos permite realizar mudanças na morfologia, nas características físico-químicas e na estrutura interna das partículas [107], [108]. A Figura 3.2 resume de forma esquemática as técnicas usadas nos processos *bottom-up* e *top-down*.

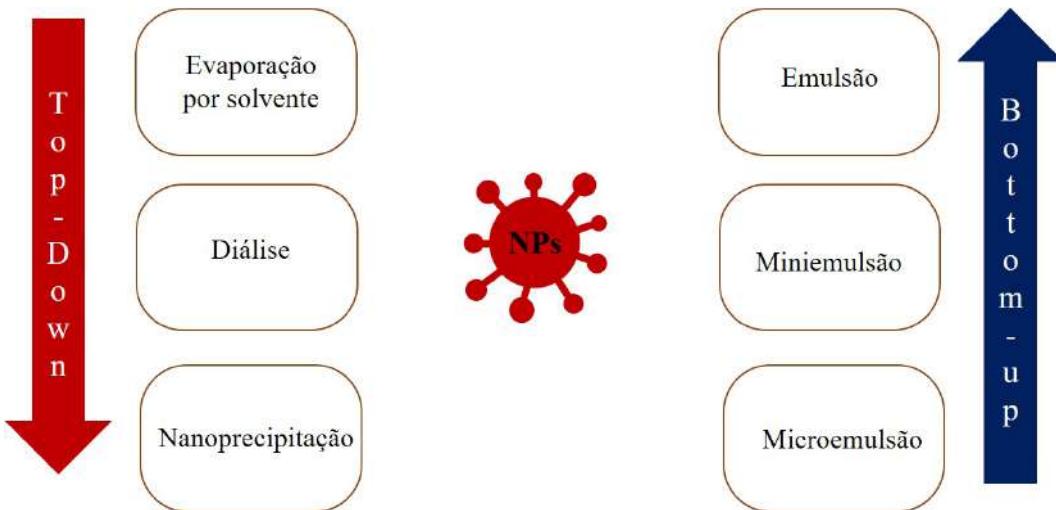


Figura 3.2: Representação esquemática das técnicas usadas para a produção de nanopartículas poliméricas.

A evaporação de solventes permite a produção de nanopartículas a partir da dispersão de polímeros pré-formados que precipitam no meio. Inicialmente as soluções poliméricas são preparadas em solventes voláteis [106]. A formação das nanopartículas ocorre por meio da lenta evaporação do solvente, quando a solução é convertida em uma suspensão de nanopartículas, quando o limite de solubilidade do polímero no solvente é atingido. Além disto, a taxa de evaporação do solvente pode ser muito importante para o processo, afetando o tamanho das partículas precipitadas, a distribuição das cargas superficiais e a composição das partículas precipitadas no caso do processamento de misturas de homopolímero e copolímeros [109].

A formação de nanopartículas por difusão de solvente requer o uso de uma fase orgânica, fase aquosa e da operação de diluição [106]. Na primeira etapa, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico parcialmente miscível em água, seguida por

emulsificação, quando a orgânica é adicionada à fase aquosa (contendo um agente estabilizante) sob agitação intensa. Finalmente, a adição de água de diluição promove a difusão do solvente orgânico para a fase externa e a produção das nanopartículas [110].

No processo por nanoprecipitação, as nanopartículas são formadas após a dispersão da fase orgânica na aquosa, quando a rápida difusão do solvente faz com que as nanopartículas fiquem dispersas na água [106]. Estes processos podem produzir partículas com variedade de tamanhos, mas podem também estar associados a problemas de toxicidade por conta do uso de solvente orgânicos [110].

Uma maneira de aprimorar as nanopartículas sintetizadas é conduzir modificações químicas de suas superfícies. As estratégias de funcionalização têm sido muito investigadas na catálise enzimática, nas ciências biomédicas, na agricultura, dentre outras. Essa técnica tem a função de inserir grupos funcionais na superfície dos nano-suportes para modificar e melhorar as propriedades características dos materiais, aumentando a capacidade de executar funções específicas. Estas alterações constituem ferramentas para a produção de materiais cada vez mais inteligentes, visando à manufatura de produtos com alto valor agregado [11], [18].

A produção de nanopartículas funcionalizadas para diversas aplicações tem despertado o interesse de muitas investigações [7], [63]. Os grupos funcionais introduzidos na superfície de uma nanopartícula podem interagir com proteínas e outras biomoléculas, por meio de diferentes tipos de interação. A inserção dos grupos funcionais na superfície das nanopartículas pode ser realizada diretamente na etapa de síntese por meio da técnica de polimerização em emulsão. Por ser um processo de funcionalização *in situ* em uma única etapa, o uso de um monômero funcionalizado para a modificação da superfície evita a necessidade de fazer pós-síntese do polímero[18], [63].

A funcionalização pode ser estratégia adotada também para produzir nanopartículas com diferentes morfologias. Recentemente, ABDOLLAHI *et al.* [16] utilizaram alguns comonômeros funcionais acrílicos (metacrilato de glicidila (GMA), metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA), 2-(dimetilamino)etila, metacrilato de 2-(dimetilamino) etila (DMAEMA) e acrilamida (AAM)) e observaram que, dependendo do grupo funcional utilizado, nanopartículas de tamanho diferentes eram geradas, com diâmetro na faixa entre 150 a 1400 nm. Além disso, os autores sintetizaram nanopartículas com morfologia couve-flor, obtidas para os copolímeros P(MMA-co-AAM) e P(S-co-HEMA) e em forma de vesículas para P(S-co-GMA).

Utilizando a técnica de microemulsão em duas etapas, foi possível estudar a influência do monômero funcional GMA na formação de nanopartículas com morfologia casca-núcleo [111]. Ademais, a pós-funcionalização foi usada como estratégia para introduzir braços espaçadores, inserindo para aumentar a estabilidade e manter

a atividade de imobilização [112].

A superfície das nanopartículas podem ainda ser funcionalizadas com o intuito de alterar a carga superficial após as imobilizações. Nanopartículas de poliestireno funcionalizado foram usadas de forma eficiente como biomarcadores para detectar inflamações por meio de interações do tecido doente com as cargas superficiais das partículas [113].

Modificações na superfície das nanopartículas poliméricas podem adicionar afinidade multivalente que permite ancoragem mais forte de compostos imobilizados e melhores propriedades de transporte, podendo penetrar mais profundamente nos tecidos através dos finos capilares e do revestimento epitelial, resultando em entrega mais eficiente de agentes terapêuticos para sítios-alvo [114].

Todos as modificações realizadas por estas pesquisas mostram os avanços possíveis com a funcionalização de nanopartículas poliméricas, seja melhorando as propriedades químicas ou físicas. As alterações específicas na superfície ocasionam aumento de atividade catalítica, mudança na morfologia e maior especificidade [16], [112].

3.1.3 Suportes heterofuncionais

As ligações envolvidas entre suporte e enzima numa imobilização por adsorção física podem ser hidrofóbicas, forças de Van der Walls e pontes de hidrogênio. Estas forças raramente afetam a conformação das enzimas, fazendo com que este tipo de imobilização resultem em altas atividades [49]. Dentre os tipos de forças mencionadas, a hidrofóbica consegue estabelecer interações estáveis com as lipases devido ao fato de que algumas dessas proteínas estão sujeitas a ativação interfacial através da tampa hidrofóbica que protege o sítio ativo. Contudo, sob certas condições de pH, de temperatura e altas concentrações iônicas, as enzimas podem ser dessorvidas [49], [115].

No caso de enzimas que interagem com o suporte por meio de ligações covalentes, existe a vantagem de estarem fortemente ligada à matriz polimérica. Nestes casos, os suportes podem ser constituídos por diferentes grupos funcionais, como grupos do tipo epóxi, aldeído, gluraldeído e tióis. Nesse contexto, AHMED *et al.* [115] compararam as técnicas de adsorção e ligação covalente na imobilização da caseinase de *Aspergillus niger* e relataram maior estabilidade da enzima quando estas eram ligadas por ligação covalente.

Por conta da possível dessorção das enzimas na imobilização por adsorção física, os pesquisadores apresentaram uma nova proposta de suportes [2], [20] [116]. Estes novos materiais podem ser capazes de promover imobilizações simultaneamente por adsorção física e ligação covalente, dependendo do pH do meio e do tipo de suportes

empregado. Para isso, primeiramente a enzima é adsorvida no suporte por meio de interações com grupamentos que favorecem a adsorção física por forças de Van der Walls, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas em pH 7. Em seguida, a mudança do pH do meio faz com que os grupamentos do suporte formem ligações covalentes e se liguem à enzima de forma permanente [117],[118].

Os suportes supracitados, que são constituídos por várias funcionalidades presentes na superfície, são denominados de suportes heterofuncionais. Estas matrizes estabelecem com as enzimas interações denominadas como ligações covalentes multiponto, que garantem uma maior estabilidade ao complexo enzima/suporte devido à formação de inúmeras ligações covalentes, fazendo com que fatores externos como temperatura e ação de solventes orgânicos não provoquem dessorção das enzimas. Contudo, há a possibilidade de ocorrerem mudanças conformacionais nas proteínas, que consequentemente podem conduzir à inativação do biocatalisador [20], [119].

A imobilização covalente multiponto requer a mudança de pH, devido ao fato de que os grupos nucleofílicos presentes na superfície das enzimas são pouco reativos em um pH neutro. Além disso, um período de tempo é requerido para que ocorra a reação entre os grupos do suporte e da enzima [120]. Estas ligações formadas fazem com que a enzima adquira maior rigidez e que fiquem insensíveis a mudanças posteriores de conformação. Consequentemente, isto pode alterar a configuração geométrica da enzima devido ao envolvimento de diferentes grupos moleculares no processo de imobilização, o que pode certamente afetar a atividade dos biocatalisadores [19], [121].

Suportes heterofuncionais podem ser produzidos com diferentes características, de modo a atender a natureza das enzimas a serem utilizadas e a finalidades de uso. Portanto, diferentes grupamentos podem ser usados para esse fim, desde que permitam a ocorrência inicial da adsorção física e apresentem grupos reativos [20]. Por exemplo, há aplicações relatadas desses suportes para a produção de biodiesel por rota enzimática, utilizando nanopartículas magnéticas heterofuncionais, manufatura de biossensores, descontaminantes de correntes líquidas e preparação de recheios para o uso em coluna de cromatografia de afinidade [63], [86],[122].

O glutaraldeído é uma molécula funcional muito usada para a preparação de suportes voltados para aplicações em imobilizações devido à capacidade de realizar interações hidrofóbicas, aniónicas e covalentes. Com essas características, esses suportes conseguem tanto adsorver fisicamente as enzimas quanto realizar ligações multipontos. Uma das desvantagem de trabalhar com o glutaraldeído é a limitação intrínseca para se ligar covalentemente com vários grupos da enzima, não sendo tão versátil. Outra desvantagem é sua baixa estabilidade em pH básico. [117] [123].

Suportes comerciais à base de glixol também têm sido bastante utilizado, pois apresentam alta estabilidade, baixo impedimento estérico e braço espaçador curto,

que faz com que as enzimas fiquem mais próximas do suporte. BOLIVAR *et al.* [124] estudaram o uso dos suportes amino-glioxil e amino-epóxido para imobilizar a enzima B-galactosidase e mostraram que os materiais preparados com glioxil permitiam mais rápida adsorção e eram mais estáveis que os materiais preparados com o grupo epóxido. Uma possível desvantagem estava associada ao uso do pH básico em suas imobilizações, permitindo apenas reações com aminas primárias não ionizáveis. Assim, estes suportes não podem ser utilizados para imobilizar boa parte dos grupamentos amínicos existentes de forma não iônica [125], [126].

O desenvolvimento de novos suportes heterofuncionais podem também contribuir para o melhoramento da estabilidade de certa enzimas, como no caso da B-galactose. Utilizando um aminado e ativado com divinilsulfona (DVS) obtido a partir de partículas de agarose, foi possível estabelecer ligações multipontuais com bastante estabilidade e rapidez em pH 10 [127].

O metacrilato de glicidila (GMA) é um monômero bastante promissor, utilizado em diversos setores da indústria de adesivas, de materiais curados, de aplicações bioquímica dentre outros setores [128]. O destaque para o GMA se deve em grande parte às propriedades do grupamento epóxido que, combinado com outros reagentes, permitem a produção de inúmeros copolímeros multifuncionais. A estrutura química do metacrilato de glicidila é ilustrada na Figura 3.3.

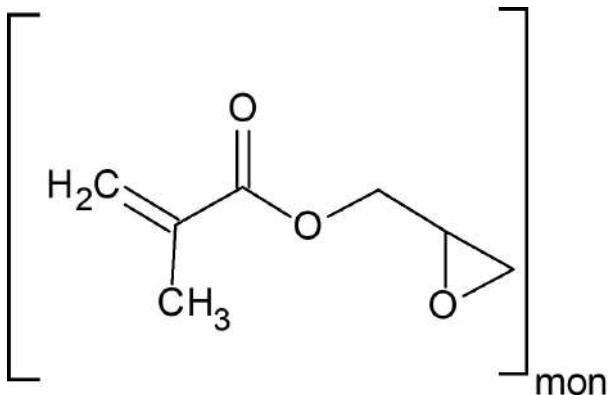


Figura 3.3: Estrutura química do monômero GMA

Os suportes que contêm o grupamento epóxido apresentam muita versatilidade para as imobilizações enzimáticas, pois o grupamento epóxido pode interagir com diversos grupos nucleófilos de uma enzima como, tióis, aminas primárias, hidroxilas e ácidos carboxílicos. Isto se deve à alta reatividade desse grupamento em função da alta tensão existente no anel, que facilita a reação com ácidos e bases [7], [116].

O grupamento epóxido pode também formar ligações intermoleculares com grupamentos aminos e carboxílicos sem necessidade de fazer qualquer tratamento prévio para imobilizar a enzima em pH neutro. Nesses contexto, TURKOVA *et al.* [129] investigaram o uso de géis baseados em metacrilato de glicidila para imobilização enzimática e verificaram que grupos aminos reagirem facilmente em pH alcalino en-

quanto, os grupos carboxílicos reagiam de forma lenta e ocasionavam a formação de éster, sendo estas ligações mais fracas.

MATEO *et al.* [116] investigaram suportes epóxidos heterofuncionais e observaram que, sob condições variadas de pH e temperatura, os grupos epóxidos formavam ligações covalentes estáveis em pH 7. Além disso, os suportes usados adquiriram ainda maior estabilidade no pH igual a 10, em virtude do aumento da reatividade do complexo enzima/suporte preparado por meio da imobilização covalente multiponto [130].

Em outro estudo, vários nano-suportes poliméricos com diferentes funcionalidades (epóxido, flúor, tiofenol, benzilamina) foram usados para realizar imobilizações com a CAL B e posteriormente testados em reações de hidrólise e esterificação. Os suportes heterofuncionais mostraram bastante afinidade por esta lipase, resultando em altos valores de rendimento, atividade de esterificação e hidrólise, quando comparado com os demais suportes sem esses grupamentos funcionais [63].

A literatura mostra que suportes comerciais epoxídicos possuem uma matriz hidrofóbica e que é necessário conduzir a imobilização em soluções tampão de alta força iônica, para promover a adsorção hidrofóbica nos suportes [7], [20], [116]. Entretanto, o uso dessas matrizes hidrofóbicas pode provocar efeitos finais indesejáveis, como perda de atividade de até 80 % e baixa estabilidade, devido às poucas ligações covalentes multiponto formadas entre o suporte e a enzima. Para compensar esse efeito, pode ser conveniente produzir suportes heterofuncionais com uma composição um pouco mais hidrofílica [119].

Outras vantagens podem também ser associadas ao uso do grupamento epóxido em imobilizações. Este suportes contam com braços espaçadores curtos que desfavorecem a ocorrência de impedimentos estéricos entre a proteína e o suporte [20]. Além disso, devido à estabilidade intrínseca desses grupos, eles podem passar por longos processos de imobilização, possibilitando o estabelecimento de ligações químicas mais intensas entre o suporte e a enzima. Uma possível desvantagem do uso do grupamento epóxido pode ser a lenta reação covalente durante a imobilização em alguns casos [20], [124].

Embora suportes como gioxil, DVS e glutaraldeído tenham permitido obter resultados muito satisfatórios, como a alta estabilidade, todos esses materiais são susceptíveis a problemas como a incapacidade de interagir com vários grupos da enzima, restrição de pH ou, como no caso do gioxil, a necessidade de usar enzimas com composições mais específicas, como por exemplo mais rica em grupos da lisina. Nesse sentido, suportes heterofuncionais que contêm o grupamento epóxido são mais promissores por conta da capacidade de reagir com os diferentes nucleófilos presentes na estrutura molecular de uma proteína, tais como tióis, aminas primárias, hidroxilas [7], [116].

3.1.4 Síntese dos nano-suportes heterofuncionais

A síntese de nanoestruturas constitui processo complexo e há uma gama de técnicas disponíveis para produzir diferentes tipos de nanopartículas. Em geral, essas técnicas são divididas genericamente em três categorias: deposição química ou física de vapor, síntese por reação química e processos de estado sólido (moagem). Utilizando as técnicas acima mencionadas, não apenas podem ser sintetizadas nanopartículas puras, mas também híbridas ou revestidas com materiais hidrofílicos ou hidrofóbicos, dependendo da adequação das aplicações [131].

3.1.4.1 Polimerização em emulsão

A reação de polimerização em emulsão envolve um iniciador solúvel na fase contínua, um surfactante e monômeros insolúveis ou pouco solúveis em água, que formam inicialmente gotas estabilizadas pelo surfactante. Quando a concentração de surfactante ultrapassa a concentração micelar crítica (CMC), esse excesso de moléculas de surfactante forma agregados esféricos chamados de micelas. Por conta da diminuição da tensão interfacial interfacial, os monômeros incham as micelas, formando nanoestruturas organizadas e estabilizadas pelas moléculas de surfactante. A adição do iniciador faz com que a polimerização se inicie na fase aquosa, gerando radicais que nucleiam as micelas inchadas com monômero, formando partículas de polímeros estabilizadas por moléculas de surfactante com diâmetro característicos de 5 a 500nm)[132], [133].

A polimerização por emulsão pode ser dividida tipicamente em três estágios. O Estágio I é caracterizado pelo início da reação, ocorrendo o aumento no número das partículas de polímero, à medida que a reação evolui. Nessa fase, o diâmetro das partículas é da ordem de 1 a 10 nm, gerando área específica muito maior que das gotas de monômero, o que facilita a captura de radicais e torna a polimerização nas gotas pouco provável. No final deste estágio, a quantidade de surfactante livre na forma de micelas inchadas como monômero é praticamente toda consumida.

No Estágio II a polimerização prossegue com produção de polímero no interior das partículas até o esgotamento dos reservatórios de monômeros. Nesse fase estão presentes a fase aquosa, partículas de látex e gotas de monômeros. Por fim, no Estágio III as gotas monoméricas já não estão presentes, restando apenas a fase aquosa e as partículas de látex, até o esgotamento do monômero nas partículas.

A polimerização em emulsão possibilita a obtenção de elevadas massas molares, quando comparada a outros métodos de polimerização via radicais livres, e elevadas taxas de reação, devido à natureza compartimentalizada do sistema de reação (os radicais permanecem ativos por muito tempo no interior das partículas de látex). Além disso, a facilidade de transferência de calor devida à natureza heterogênea e

baixa viscosidade do meio permitem a manutenção das altas taxas de reação características do processo. Finalmente, o processo permite o de controle do tamanho e morfologia das partículas submicrométricas. [134], [135].

Nesse contexto, a técnica de polimerização por emulsão é também muito adequada viável para realização de copolimerizações, em que é possível fazer a incorporação de dois ou mais monômeros com diferentes propriedades físicas e químicas na estrutura do polímero, para uma determinada finalidade. Além disso, por meio da reação de copolimerização é possível obter materiais com características específicas, combinando as propriedades dos monômeros utilizados. Outra possibilidade é fazer a inserção de grupos funcionais com auxílio de agentes reticulantes para tornar o material insolúvel, melhorar as propriedades mecânicas e aumentar a diversidade de produtos poliméricos [63], [136].

Outro ponto importante nesse contexto é a combinação de monômeros com diferentes solubilidades em água, levando a formação de polímeros com características distintas. Nesse cenário, monômeros com menores solubilidades tendem a formar partículas de maiores tamanhos, enquanto que monômeros mais solúveis geralmente dão origem a menores partículas. A diferença de solubilidades entre os monômeros envolvidos numa copolimerização constitui fator operacional relevante, pois monômeros mais solúveis são os agentes de nucleação de partículas e promovem maiores taxas de entrada e saída das partículas de látex, onde a reação de polimerização efetivamente ocorre [133], [137].

Ainda nesse contexto, monômeros derivados dos ácidos acrílicos e metacrílicos exibem uma maior solubilidade em água que a maior parte dos monômeros vinílicos, como estireno. Assim, enquanto o metacrilato de metila (MMA) possui uma solubilidade em torno de 150 mmol/L e o metacrilato de glicidila (GMA) de 210 mmol/L em água, monômeros hidrofóbicos como divinilbenzeno e estireno apresentam solubilidade de 1,45 e 4,3 mmol/L em água, respectivamente [133].

SAJJADI [137] investigou o processo de alimentação semicontínua de monômeros em uma copolimerização, no qual tendo sido possível obter altas taxas de reação e uniformidade das partículas, fazendo-se apenas o controle da taxa de nucleação de partículas por meio da adição controlada de monômeros. Em seguida, os autores observaram que partículas de menores tamanhos eram obtidas quando utilizavam monômeros do metacrilato de metila e acetato de vinila nas composições.

A influência dos grupos hidrofílicos sobre o andamento de reações de copolimerização também foi avaliada por AHMAD *et al.* [138], que investigaram possíveis mudanças induzidas por mudanças das concentrações do surfactante, iniciador e a concentração dos monômeros. Foi observado que o diâmetro das partículas aumentava, à medida que a concentração do monômero hidrofílico (metacrilato 2-hidroxietil - HEMA) era alterada de 50 % para 70 % e a concentração do monômero mais hi-

drofóbico (estireno) diminuía, de forma que a cinética de reação era controlada pelo HEMA.

O monômero MMA é bastante utilizado nas áreas farmacêuticas, cosméticas e como suportes para imobilizações, por apresentar características como biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, esse monômeros usualmente resulta em altas taxas de reação, cinética de polimerização rápida, baixa degradabilidade e grande capacidade de incorporação de outro monômeros, quando copolimerizado com outros grupos [139].

CUNHA *et al.* [136] produziram suportes casca-núcleo contendo diferentes quantidades de metacrilato de metila. Estas matrizes poliméricas foram usadas para imobilização da lipase CAL B e comparadas com o suporte comercial *Acurrel*. As características dos suportes sintetizados com PMMA foram a maior hidrofilicidade e menor área específica, quando comparado aos demais polímeros usados. Além disso, os biocatalisadores preparados resultaram em melhor desempenho nas atividades de hidrólise, quando comparado ao suporte comercial *Acurrel*.

O divinilbenzeno (DVB) é outro monômero bastante utilizado no campo da produção de suportes heterofuncionais [86], [140]. Este monômero participa da copolimerização como um agente reticulante, promovendo a formação de ligações cruzadas com duas insaturações presentes nas extremidades da molécula. Na ausência de um agente reticulante, os suportes podem apresentar baixa estabilidade química e serem solúveis na maioria dos solventes. Além disso, os agentes reticulantes geralmente provocam a formação de maiores área específicas e melhores propriedades térmicas [140] .

BAYRAMOGLU *et al.* [141] estudaram a produção de nanopartículas magnéticas de MMA, GMA e dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) na imobilização da enzima *B-galactosidase*. Os autores propuseram a síntese do suportes por polimerização em suspensão, produzindo esferas magnéticas micrométricas com área de 16,2 m²/g. Apesar da baixa área deste suporte, foi possível manter boa parte da atividade em diferentes condições de pH e temperatura.

LIU *et al.* [142] sintetizaram um suporte heterofuncional com os monômeros EGDMA, HEMA e GMA por polimerização em emulsão. A emulsão conduzida na ausência de surfactante gerou partículas uniformes, com tamanho de 400 nm e com alta área específica para a imobilização de enzimas. Em comparação com o suporte comercial epóxi (Eupergit C), os autores obtiveram resultados satisfatórios como alta capacidade de carga enzimática.

PINTO *et al.* [63] aplicaram a polimerização em emulsão para promover a funcionalização de nano-suportes heterofuncionais *in-situ* e por pós-funcionalização. As funcionalizações se mostraram sucedidas, gerando suportes com diferentes funcionalidades, as quais não afetaram a morfologia das partículas esféricas. A utilização do

GMA como comonômero nas reações P(S-co-DVB) gerou aglomerados que aumentaram o tamanho das partículas, consequentemente resultando em menores áreas específicas. Nos ensaios de imobilização com a lipase CAL B, todos os suportes funcionalizados levaram a melhores desempenhos das atividades de hidrólise e esterificação.

Vários estudos recentes têm utilizado os monômeros MMA, DVB e GMA para produzir suportes enzimáticos usando técnicas de polimerização em emulsão e suspensão. PINTO [62] fez um estudo voltado para o aumento de área e porosidade dos biocatalisadores baseados em P(S-co-DVB) e P(MMA-co-DVB) chegando na finalização do trabalho com uma área de $50\text{ m}^2/\text{g}$.

Por fim, a técnica de polimerização em emulsão também tem sido usada como ferramenta para aumentar a densidade de grupamentos funcionais na superfície de suportes heterofuncionais, aumentando a capacidade de imobilizações com proteínas. Por exemplo, SONG *et al.* [143] verificaram o aumento da concentração de metacrilato de glicidila (GMA) na composição da copolimerização de P(S-co-DVB) aumentou a densidade de carga específica.

3.2 Materiais, metodologia e técnicas de caracterização

3.2.1 Produção dos nano-suportes heterofuncionais

A escolha dos monômeros para o desenvolvimento dos nano-suportes, a serem estudado no presente capítulo foi baseada no grupo de suportes do Capítulo 1. Para tal fim, foram analisados os desempenhos dos biocatalisadores nas atividades de hidrólise e esterificação e na adição de funcionalidade e estabilidade química.

A base para o desenvolvimento dos nano-suportes foi o metacrilato de metila, devido ao melhor desempenho do suporte P(MMA-co-DEAEMA) nas atividade de esterificação que continham MMA em sua composição. O segundo monômero escolhido foi o divinilbenzeno, devido à capacidade de reticulação das cadeias poliméricas para tornar os nano-suportes insolúveis ao meio reacional. E por último, para conferir funcionalidade aos nano-suportes, optou-se pelo uso do metacrilato de glicidila (GMA), pois dentre todos os monômeros analisados nos grupos de suportes do Capítulo 2 este têm características promissoras na interação com a lipase CAL B. Por último, com base nos resultados apresentados pelo suportes comerciais decidiu-se, desenvolver nanobiocatalisadores com a intenção de gerar nano-suportes de alta área específica e porosidade, além disso capazes de estabelecer tanto adsorções físicas quanto ligações covalentes com a lipase.

A Tabela ?? apresenta os reagentes utilizados para a síntese dos nano-suportes,

sendo os três primeiros reagentes referentes à fase orgânica e usados na composição dos nano-suportes.

- **Divinilbenzeno - DVB** - monômero com pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Sigma-Aldrich;
- **Metacrilato de glicidila - GMA** - monômero com pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Sigma-Aldrich;
- **Metacrilato de metila - MMA** - monômero com pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Sigma-Aldrich;
- **Bicarbonato de sódio - NaCO₃** - tampão. Fornecedor Vetec Química Fina;
- **Hidroquinona - NHQ** - inibidor com pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Vetec Química Fina;
- **Lauril sulfato de sódio - LSS** - emulsificante com pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Vetec Química Fina;
- **Persulfato de sódio - KPS** - iniciador com pureza $\geq 99\%$. Fornecedor Vetec Química Fina;

3.2.2 Equipamentos usados na síntese e caracterização dos nano-suportes

Os equipamentos utilizados para a síntese e caracterização dos nano-suportes foram:

- **Balança analítica** - U210A, BEL Equipamentos Analíticos Ltda., São Paulo –Brasil.
- **Mini-reactor para polimerização** - EasyMax 102, Mettler Toledo, Ohio –EUA, com volume máximo de 100 mL, encamisado com controle automático de temperatura e equipado com termopar, agitador e condensador;
- **Distribuição do tamanho de partícula** - equipamento Nano Brook Zeta PALS com varredura de 1 nm até 100 µm Holtsville, Nova York e Malvern Instruments, Malvern – Reino Unido.
- **Microscópio eletrônico de varredura (MEV)** – Versa 3D, Fei Company Eindhoven, Holanda.
- **Espectrômetro na região do infravermelho - FTIR 3100** Thermo Fisher Scientific, modelo Nicolet 6700 , Massachusetts, EUA.

- **Cromatógrafo de permeação em gel- GPC** - modelo Max VE 2001, Viscotek, Worcestershire Inglaterra.
- **Ângulo de contato** - tensiômetro Kruss Process modelo K100, Hamburg, Alemanha.
- **Porosidade** - modelo ASAP 2020, Micromeritics, Norcross, GA, EUA.

3.2.3 Metodologia

A síntese dos nano-suportes poliméricos foi feita por meio da polimerização em emulsão. Como discutido anteriormente, nesta técnica são utilizados um iniciador solúvel em água e os monômeros são dispersos na fase aquosa contínua, por meio dos via radicais livres oriundos da decomposição do iniciador. Por fim, o sistema é estabilizado pela presença da solução tampão e do surfactante no meio. A Figura 3.4 apresenta a unidade experimental utilizada para realização das reações de homo e copolimerização dos nano-suportes.

As reações dos nano-suportes foram realizadas em um mini-reactor de vidro nas condições de 800 rpm e temperatura de 80 °C. O procedimento descrito foi proposto por PINTO *et al.* [61] e está descrito a seguir. Primeiramente, foi preparada a fase aquosa, contendo a solução 10,19 g do agente tamponante NaHCO₃ e 16,792 g da solução contendo o emulsificante LSS. Essa solução foi incorporada previamente no mini-reactor, que continha cerca de 35 mL de água para melhor dispersão dos componentes. Finalizada essa adição, as condições de temperatura e agitação foram ajustadas para as condições de reação.

Para a preparação da fase orgânica, foram propostas quatro reações, como pode ser visualizado na Tabela 3.1. A primeira consistiu na homopolimerização do MMA; a segunda na copolimerização dos monômeros MMA e DVB (25% em massa); enquanto na terceira e quarta reações foram feitas incorporações do monômero funcional GMA em concentrações diferentes e iguais a 25 e 50 % em massa.

Tabela 3.1: Reações obtidas de copolimerização conduzidas para a preparação dos nano-suportes.

Siglas	Reações	Descrição
PM	PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PMD	P(MMA-co-DVB)	Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno)
PMDG 25 %	P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 %	Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno-co-metacrilato de glicidila) 25 % m/m de GMA
PMDG 50 %	P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %	Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno-co-metacrilato de glicidila) 50 % m/m de GMA



Figura 3.4: Reator empregado para a síntese dos nano-suportes.

As polimerizações foram conduzidas em semi-batelada para tentar evitar um possível descontrole térmico. Para este fim, a carga monomérica inicial convencional para alimentar o sistema foi de 10 g e em seguida fez-se a adição do iniciador. Finalizada essa etapa, foi fixada uma carga de 20 g, distribuídas ao longo de 1h nas reações com intervalos de 10 min. Terminada a alimentação do sistema, a reação de polimerização ocorreu por mais 5h.

Ao longo da etapa de reação, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo fixos e iguais a 15, 30, 60, 120, 180, 240 300 e 360 min para posteriormente determinar as conversões obtidas. O látex produzido no final de todas as reações passou por uma etapa de secagem por liofilização. Após a liofilização, os nano-suportes foram direcionados para caracterizações e ensaios de imobilização.

3.2.4 Caracterização dos nano-suportes

3.2.4.1 Determinação da conversão e rendimento das reações

As alíquotas retiradas nos intervalos de tempo especificados foram usadas para a construção da curva de conversão monomérica. As alíquotas do material foram adicionadas em copinhos de alumínio que continham 10 gotas de uma solução aquosa de hidroquinona 1 % (m/m) (0,5 g de hidroquinona e 49,5 g de água destilada), sendo esta responsável por inibir a reação. A amostra úmida foi pesada e, em seguida, os copinhos foram levados a uma estufa de recirculação a 50 °C até a completa evaporação do solvente. Após a evaporação da fase líquida (água e monômero residual),

foi realizada a pesagem dos copinhos secos contendo os polímeros. A técnica gravimétrica consiste em estimar a conversão como a razão entre a massa de polímero seco obtido e a massa de monômero inicial na amostra, de acordo com a Equação 3.1.

$$X = \frac{M_{poliseco} + copinho - (M_{copinho} + M_{hidroquinona})}{Y_{organica} M_{latex}} \quad (3.1)$$

Para o cálculo do rendimento, obtido após a etapa de liofilização utilizou-se a Equação 3.2, a massa seca obtida era dividida pela massa da mistura monomérica obtida no final da emulsão,

$$r = \frac{m_{polímero}}{m_{monômeroemuls}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

sendo:

r o rendimento;

$m_{polímero}$, a massa de polímero seco obtida ao final da etapa da liofilização;

$m_{monômeroemuls}$, a massa total de monômeros adicionada na etapa de emulsão.

3.2.4.2 Distribuição de tamanhos de partícula

Para a análise das distribuições dos tamanhos de partícula, as amostras (suspensão e pó) foram caracterizadas pela técnica de espalhamento dinâmico da luz - DLS. Nesta técnica um feixe de luz incide sobre suspensão de partículas e é espalhada por uma combinação de fenômenos, que incluem radiação, reflexão, difração e transmissão [144]. Nesse ensaio, foram adicionadas 1 ou 2 gotas de látex numa cubeta e completado o volume até o menisco da cubeta com água destilada. Em seguida, foi utilizado o equipamento Nano Brook Zeta PALS (Holtsville, Nova York) para obter a distribuição do tamanho das partículas em escala nanométrica. Já para a análise de tamanhos dos pós liofilizados, foi utilizado um analisador de distribuição de tamanhos de partículas da Malvern Instruments (Malvern - Reino Unido), no qual as amostras em pó foram adicionadas na cuba de amostragem, mantidas em suspensão aquosa e agitadas durante a leitura.

3.2.4.3 Área específica e porosidade

A área específica e porosidade de um material sólido podem ser determinadas pelas quantidades necessárias de adsorvato para recobrir com uma monocamada a superfície de um sólido. O processo de adsorção pode ocorrer com o auxílio do aumento da pressão, para que a pressão parcial do gás usado como sonda promova a adsorção crescente do gás sobre o suporte até a saturação [145].

Antes do procedimento de construção da isoterma de equilíbrio, como função da

pressão parcial do gás, as amostras são submetidas a um pré-tratamento, em que são submetidas a vácuo a uma temperatura de 60 °C de modo que não danifique a amostra, com a finalidade de remover por completo a presença de água e voláteis que estejam eventualmente na amostra.

Para este estudo foi utilizado um analisador de superfície BET modelo ASAP 2020 (Micromeritics, Norcross, GA, EUA) que se baseia no processo de fisissorção de nitrogênio há uma pressão de condensação de 77 °K. Para gerar a curva de adsorção, uma quantidade do gás é injetada no sistema, sendo observado em seguida que a pressão decresce até atingir uma pressão de equilíbrio. Após o processo de adsorção (usualmente chamado de condensação), é realizado processo de dessorção, observando-se frequentemente um fenômeno de histerese, evidenciada pela diferença entre as curvas de adsorção e dessorção [146].

3.2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para o estudo morfológico das partículas, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Versa 3D, Fei Company Eindhoven-Holanda). Nesta técnica, um fino feixe de elétrons interage com a superfície, que reage a essas interações por meio da excitação dos elétrons [147]. Os elétrons secundários espalhados geram então as imagens topográficas de alta resolução da superfície da partícula. Para esta análise, as amostras foram primeiro revestidas com uma fina camada de ouro em um metalizador JFC 1500 (Jeol LTDA) e as imagens foram obtidas no modo de alto vácuo operando com tensão máxima de 30 kV.

3.2.4.5 Espectroscopia com transformada de Fourier - FTIR

As moléculas possuem momentos vibracionais que correspondem a níveis de energias. Dependendo da forma com que as moléculas vibrem ou rotacionem, provocam mudanças no momento dipolo e isso pode ser observado por meio da absorção de luz, em frequências específicas de vibração. Assim, variando-se a frequência da radiação eletromagnética que incide sobre a amostra, obtém-se um espectro de absorção [148].

As vibrações ocasionadas nas moléculas podem ser observadas comumente na forma de alongamento da ligação ou por conta da vibração angular. O alongamento ou estiramento envolve a variação continuada da distância interatômica ao longo do eixo de ligação entre os dois átomos envolvidos, podendo ser simétrico ou assimétrico. No caso das vibrações angulares, por sua vez, pode ocorrer a variação dos ângulos entre as duas ligações podendo de forma também simétrica ou assimétrica [149].

O espectro de infravermelho é gerado quando um feixe de luz infravermelha atravessa uma amostra, sendo que parte é absorvida e outra transmitida. Com base no feixe de luz transmitida é possível identificar a quantidade de luz absorvida em

cada comprimento de onda. A técnica pode ser implementada com um feixe de luz monocromática (cujo comprimento de onda varia no tempo) todos os comprimentos de onda de uma única vez [148] [149]. As análises de FTIR foram realizadas no equipamento da Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700 (Massachusetts, EUA) e a faixa de números de onda aplicada foi de 500 a 4000 cm^{-1} . As análises foram feitas em modo de ATR (reflectância atenuada) e os espectros foram salvos como médias de 128 varredura.

3.3 Resultados

3.3.1 Análise da conversão e rendimento

Para avaliar a evolução da conversão de monômeros foi usada a análise gravimétrica. Como descrito na seção anterior, o é baseado na razão entre a massa de polímero formado e a massa inicial de monômero. A Figura 3.5 apresenta o gráfico da conversão como função do tempo, mostrando a evolução do perfil de conversão para cada reação.

A Figura 3.5 mostra que foram alcançados conversões acima de 80 % ao final da reação para os quatro tipo de suportes estudados. Esse resultado já podia ser esperado por conta da alta reatividade dos monômeros utilizados (MMA, DVB e GMA). A conversão do polímero puro (PMMA) foi a mais elevada dentre as reações avaliadas, alcançando em menos de uma hora uma conversão em torno de 95 %. Essa alta conversão também foi relatada por SAJJADI [137] e UPADHYAYA *et al.* [150] para reações de homopolimerização de MMA, de forma que esses valores corroboram os dados encontrados na literatura.

A adição do agente reticulante (DVB) provocou uma pequena queda nas taxas de reação, mas isso não levou a diferenças significativas na conversão final. Como o DVB é um agente reticulante com baixa solubilidade em água, ele tem maior afinidade com a fase orgânica, onde copolimeriza com o MMA. A redução das altas taxas de reação de polimerização características da reação de MMA, quando DVB é adicionado à carga de monômeros, foi também observada por outros autores [151], em função da menor reatividade do DVB.

Outro efeito analisado foi o da concentração do comonômero funcional GMA (25 e 50 %) no suporte. Para a maior concentração de GMA presente foi observado que as conversões atingiram valores mais altos. Isso mostra que adição desse comonômero ao meio reacional eleva as taxas de reação, em relação às corridas em que foi adicionado DVB no meio reacional. Esses resultados mostram a relativamente alta reatividade do monômero GMA, como relatado [111], [143]. As altas conversões atingidas também indicam claramente a incorporação do GMA no produto

final, como desejado.

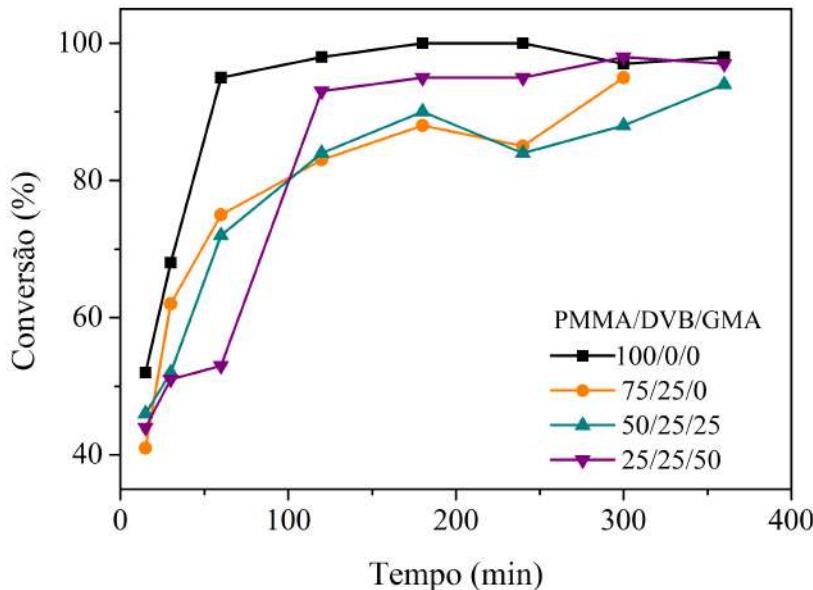


Figura 3.5: Conversões totais dos monômeros nas reações de PMMA, P(MMA-co-DVB), P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.

Outro variável monitorada foi o rendimento (Figura 3.6) dos polímeros que foram obtidos após o processo final de liofilização. O rendimento foi calculado com baseado na pesagem final do material liofilizado em relação à quantidade total de monômero adicionado no inicio de cada reação. Os resultado mostram que adição do comonômero GMA contribuiu para o aumento nos rendimento, assim como no aumento das velocidades das reações (PMDG 25 % e PMDG 50 %). Deve ser ressaltado que os rendimentos não espelham necessariamente os resultados de conversão, tendo em vista que parte do material é perdido durante as operações de secagem e coleta. Os altos rendimentos, no entanto, mostram que os produtos podem ser obtidos em grandes quantidades no ambiente laboratorial.

3.3.2 Distribuição dos tamanhos de partícula

Para as análises das distribuições dos tamanhos de partículas foram colocadas duas gotas de cada látex em cubetas, que foram diluídas e completadas com volume de água até a marcação da cubeta, na forma já descrita anteriormente, obtendo-se ao final uma suspensão translúcida. Ao final da análise, foram obtidas a distribuição dos tamanhos e os diâmetros médios das partículas dos nano-suportes produzidos.

A Figura 3.7 apresenta as distribuições dos tamanhos das partículas para cada látex (PM, PD, PDG 25 %). Foi observado que todas as curva obtidas eram unimodais e que a distribuição do PMMA era mais estreita e deslocada para diâmetros

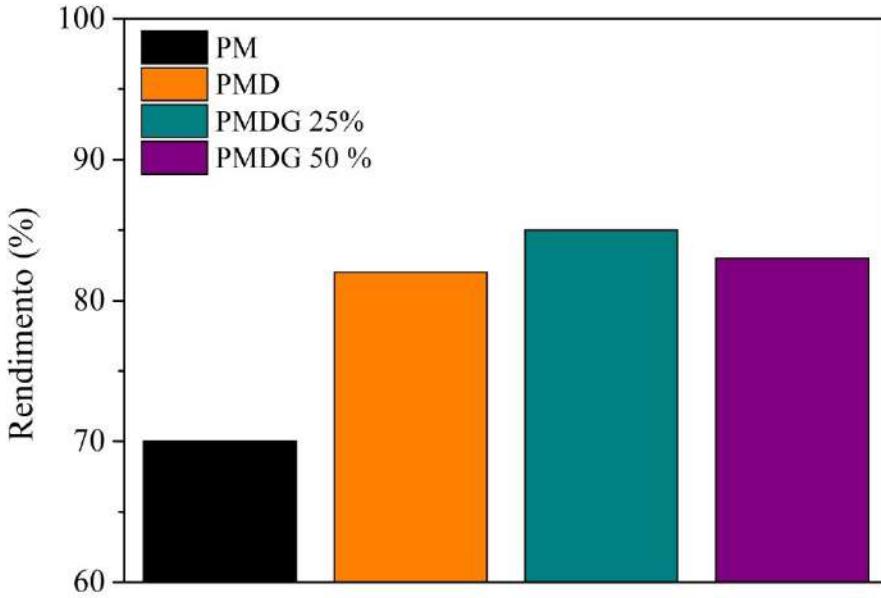


Figura 3.6: Rendimento totais dos nano-suportes à base de PMMA, P(MMA-co-DVB), P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.

menores possui menores. SAJJADI [137] estudou a polimerização dos monômeros MMA e acetato de vinila e mostrou que os monômeros mais hidrofílicos geraram partículas com menores diâmetro devido às maiores taxas de entrada e saída dos radicais das partículas, que também promove o aumento das taxas de nucleação de partículas pelos mecanismos micelar e homogêneo. Além disso, estes autores obtiveram partículas com diâmetros médios de 24 nm com MMA puro, similares aos obtidos no presente trabalho.

Com base ainda na Figura 3.7, é possível observar um deslocamento das distribuições de tamanho para maiores valores na presença do agente reticulante DVB. Esse aumento no tamanho das partículas pode ser atribuído ao fato que o DVB possui dois grupos vinílicos que reagem para formar uma estrutura em rede. Nesse caso, o aumento expressivo das viscosidades das partículas de polímero pode resultar na aglomeração das partículas nucleadas e no aumento dos tamanhos médios das distribuições [140]. Tendo em vista que a quantidade de surfactante usada foi a mesma da reação de PMMA e que o DVB é muito pouco solúvel em água, não parece razoável considerar que o aumento dos tamanhos pode estar associado a um menor número de partículas nucleadas. Esse fator também foi observado por PINTO [62] ao analisar diferentes composições de DVB nas copolimerizações.

A Figura 3.7 mostra também que a adição do GMA na reação (PDMG 25 %) contribui como o aumento do diâmetro das partículas. NORAKANKORN *et al.* [111] e SONG *et al.* [143] também observaram esse aumento no tamanho das partículas com o aumento das concentrações GMA nas copolimerizações. Esses autores mostraram que a adição de surfactante não afetava o aumento substancial do diâmetro

das partículas nesses casos. PINTO [62] propôs que o aumento da concentração de GMA faz com que ocorra uma maior interação entre os grupamentos do epóxido de partículas distintas, provocando a aglomeração e deslocamento das distribuições de tamanho. NORAKANKORN *et al.* [111] observaram este mesmo efeito na síntese de partículas casca-núcleo, atribuindo à alta reatividade do GMA, principalmente quando este se encontra em uma maior razão de alimentação na copolimerização. Por fim, devido à alta viscosidade do látex resultante da reação PDGM 50 %, não foi possível fazer a análise de distribuição de tamanhos dessa amostra. A viscosidade elevada pode ser resultante da reação na fase aquosa (por conta da presença de maior quantidade de GMA no meio reacional), já que a solubilidade do GMA na água é igual a 50 g/L, na temperatura ambiente, muito maior que as solubilidades do MMA e do DVB, iguais respectivamente a 15 g/L e 5 mg/L. O aumento da viscosidade pode ter resultado também da aglomeração de partículas por conta da reação superficial envolvendo grupamentos epóxido de diferentes partículas [62].

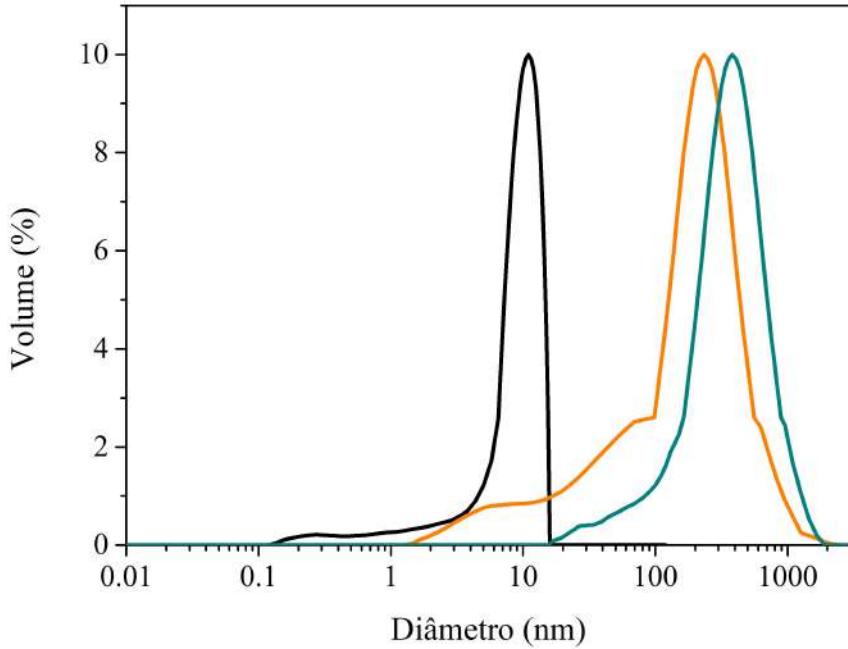


Figura 3.7: Distribuições dos tamanhos de partícula nos látexes de PMMA, P(MMA-co-DVB) e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 %.

Após a liofilização dos materiais, as distribuições de tamanho de partícula foram uma vez mais caracterizadas. A Figura 3.8 apresenta as distribuições de tamanho de partícula dos nano-suportes secos. Nota-se que os materiais secos apresentaram tamanhos médios de partícula muito maiores que observados nos látexes originais. Isso mostra que no processo de liofilização as partículas passaram da escala nanométrica para a micrométrica, ficando claro que a técnica de secagem utilizada causou agregação das amostras. Esse resultado pode também ser visto na Tabela 3.2.

Em relação às distribuições, salienta-se que para os nano-suportes PMD e PMDG

Tabela 3.2: Tamanho médios das partículas presentes nos látex e nos materiais e liofilizados.

Reações	Látex (nm)	Material liofilizado (μm)
PMMA	30	90
P(MMA-co-DVB)	234	130
P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 %	382	120
P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %	*	93

* O material apresentou consistência que impediu a análise

50 % as distribuições foram mais largas e revelaram a presença de pequena porção de partículas nanométricas. Estes dados mostram que a energia acumulada na superfície das nanopartículas pode ter provocado a agregação durante o processo de secagem, sendo que o produto produzido à base de PMMA levou a maior aglomeração mais eficiente exatamente por ter menor tamanho médio.

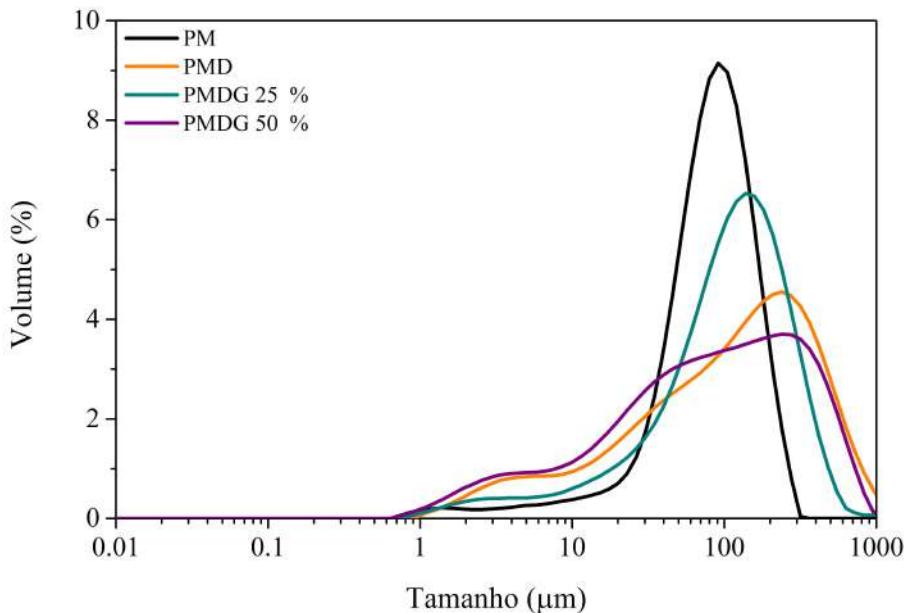


Figura 3.8: Distribuições de tamanho das partículas após a liofilização dos nano-suportes PMMA, P(MMA-co-DVB), P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.

3.3.3 Área específica e porosidade

A Figura 3.9 mostra as isotermas dos nano-suportes de PM e PMD, enquanto a Figura 3.10 apresenta as isotermas dos nano-suportes heterofuncionais PMDG 25 % e PMDG 50 %. Essas isotermas apresentam a capacidade adsorção efetiva de cada nano-suporte sintetizado.

Segundo a classificação da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) há tipos distintos de isotermas e cada deles apresenta características

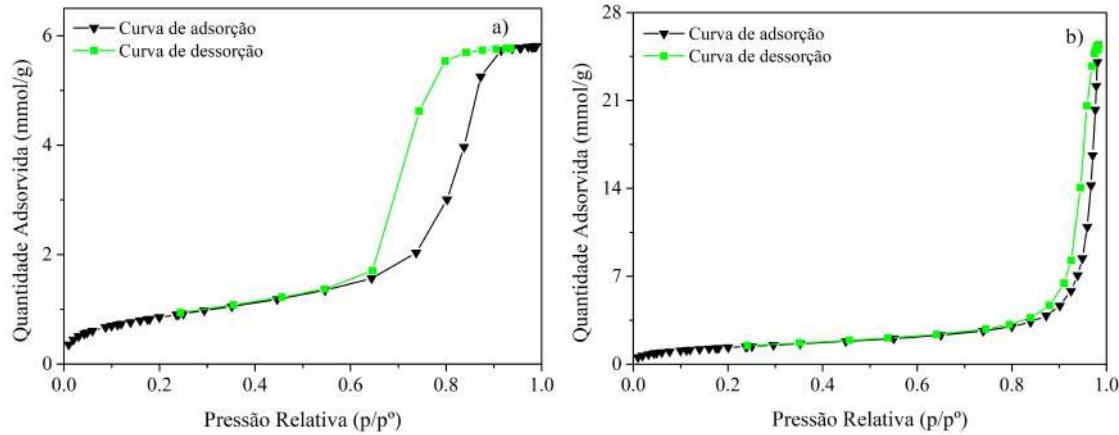


Figura 3.9: Analise de fisissorção por nitrogênio. a) PMMA) e b) P(MMA-co-DVB).

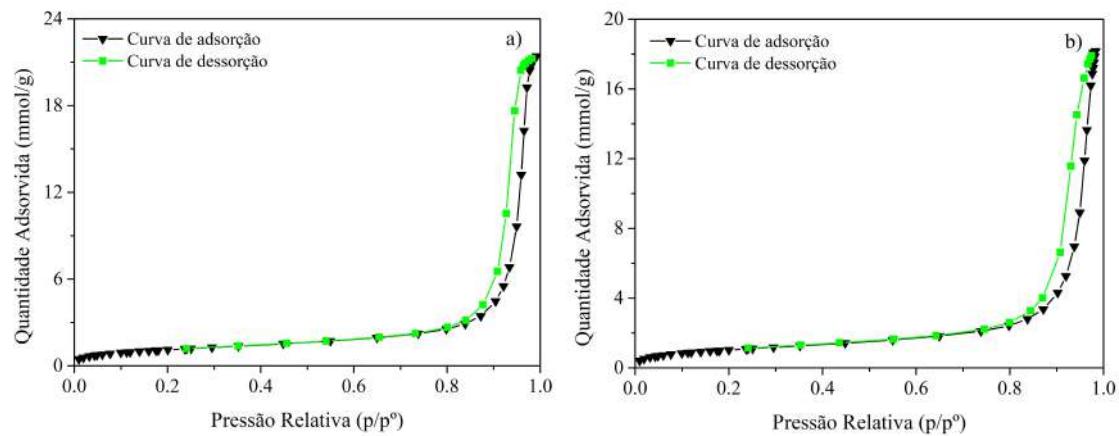


Figura 3.10: Analise de fisissorção por nitrogênio. a) P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e b) P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.

particulares [146]. Segundo essa classificação, todos os nano-suportes sintetizados foram compatíveis com o tipo IV, haja visto que em todos os casos foi observada o fenômeno de histerese, que indica a formação de condensação capilar de gás nos poros dos nano-suportes, indicando a formação de um material mesoporoso [145], [146].

Ao observar as isotermas geradas para os nano-suportes é possível verificar que o homopolímero de PMMA apresentou uma isoterma que adsorveu menor quantidade de gás em relação aos demais nano-suportes, em decorrência da saturação rápida dos seus poros a pressões relativas mais baixas. Foi também observado que as demais isotermas dos nano-suportes (PMD, PMDG 25 % e PMDG 50 %) requerem maior quantidade de nitrogênio a uma pressão relativa mais elevada para que seus poros fossem preenchidos, permitindo inferir que esses nano-suportes possuem um volume de poros bem maior que o nano-suportes à base de PMMA [145], [152].

Quanto ao tipo da curva de histerese, os nano-suportes produzidos podem ser associado ao tipo H1, que é característico de material sólido aglomerado com mor-

fologia esférica [146] ([152]). Além disso, foi possível notar uma diferença entre o comportamento da curva de histerese do PMMA e dos demais nano-suportes. A curvatura mais acentuada da curva do PMMA pode ser atribuído ao tamanho dos poros, sendo possível inferir que este material possui poros menores e estreitos. Este tipo de poros gera diferenças pronunciada no processo de condensação e evaporação, devido às maiores forças de atração resultantes da maior aproximação das moléculas [153].

As características de cada material aqui comentadas foram confirmadas com o auxílio das propriedades texturais analisadas de forma quantitativa e apresentadas na Tabela 3.3. Nesse contexto, nota-se que a área específica aumentou de forma expressiva com a adição de DVB, confirmando resultados obtidos por outros autores. Em particular, o processo de reticulação das cadeias estabiliza a formação de poros de menor diâmetro por conta do empacotamento menos eficiente das cadeias poliméricas. Nota-se também que as áreas específicas diminuíram com a adição de GMA, o que pode ser ao menos parcialmente resultante do aumento dos tamanhos médios das partículas e do processo de liofilização.

Com base nos valores dos diâmetros de poro obtidos, os nano-suportes podem ser classificados como mesoporosos (diâmetro de poros entre 20 e 500 Å) [145], [146].

Tabela 3.3: Propriedades texturais dos nano-suportes secos produzidos.

Amostra	Área específica (m ² /g) BET	Volume de Poros (cm ³ /g) BJH	Diâmetro de Poros (Å)
PM	70	0,20	114
PMD	110	0,88	319
PMDG 25 %	91	0,74	323
PMDG 50 %	85	0,63	295

3.3.4 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

Algo importante a ser analisado é a característica superficial dos nano-suportes, o que é possível com auxílio da técnica de microscopia eletrônica de varredura. A Figura 3.11 mostra micrografias dos nano-suportes à base de PMMA, sendo possível observar a presença de nanopartículas esféricas com diâmetros compatíveis com os medidos por espalhamento de luz. Além disso, as micrografias mostram que o material é relativamente homogêneo que as partículas estão compactadas. É possível notar a presença de pequenos espaços entre as partículas esféricas que constituem o material seco, corroborando a análise apresentada de fisissorção sobre o tamanho dos poros.

A Figura 3.12 apresenta micrografia do nano-suporte preparado com adição de DVB, sendo possível observar a mesma estrutura já discutida para o suporte de

PMMA, o que parece corroborar a interpretação proposta para os resultados discutidos anteriormente e confirmar a compactação das partículas durante o processo de liofilização.

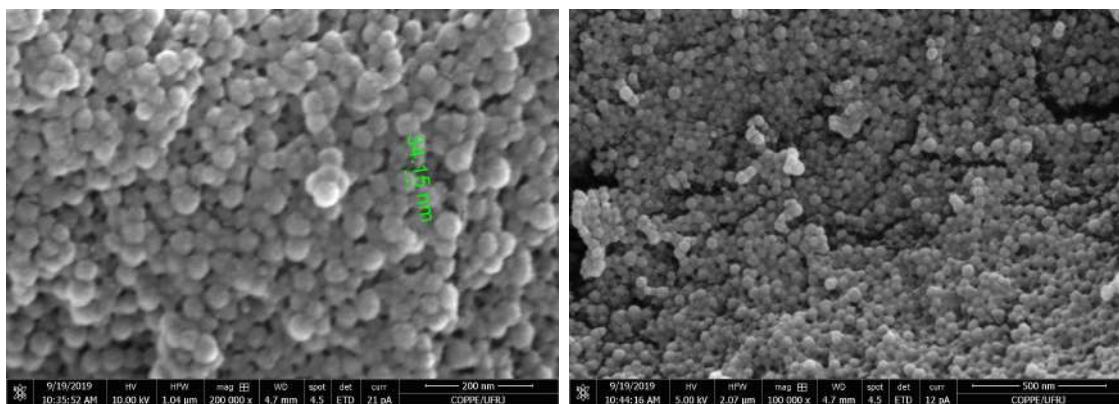


Figura 3.11: Micrografias de MEV do nano-suporte PM com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.

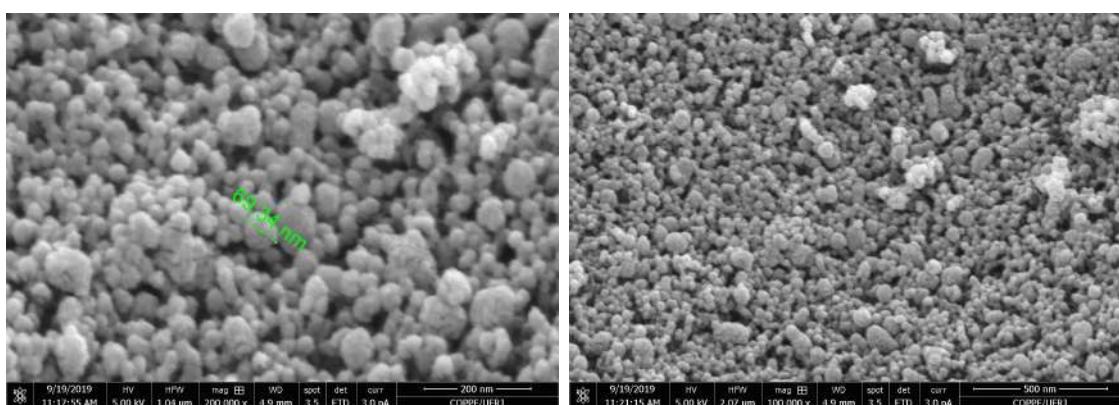


Figura 3.12: Micrografias de MEV do nano-suporte PMD com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.

As Figuras 3.13 e 3.14 apresentam micrografias dos materiais preparados com o comonômero funcional GMA com 25 % e 50 %. Uma vez mais, é possível observar a mesma estrutura genérica já discutida para o suporte de PMMA, corroborando a interpretação proposta para os resultados discutidos anteriormente e confirmando a compactação das partículas durante o processo de liofilização. Em particular, para o nano-suporte produzido com 50 % de GMA, as micrografias comprovam a formação de nanopartículas e a compactação durante o processo de liofilização, apesar da impossibilidade de obter as distribuições de tamanho das partículas presentes no látex por espalhamento de luz. Vê-se também nesse caso que as partículas nanométricas parecem estar mais aglomeradas que as demais, reforçando a interpretação proposta anteriormente sobre o processo de aglomeração induzido pela interação de grupos-mentos epóxido de diferentes partículas.

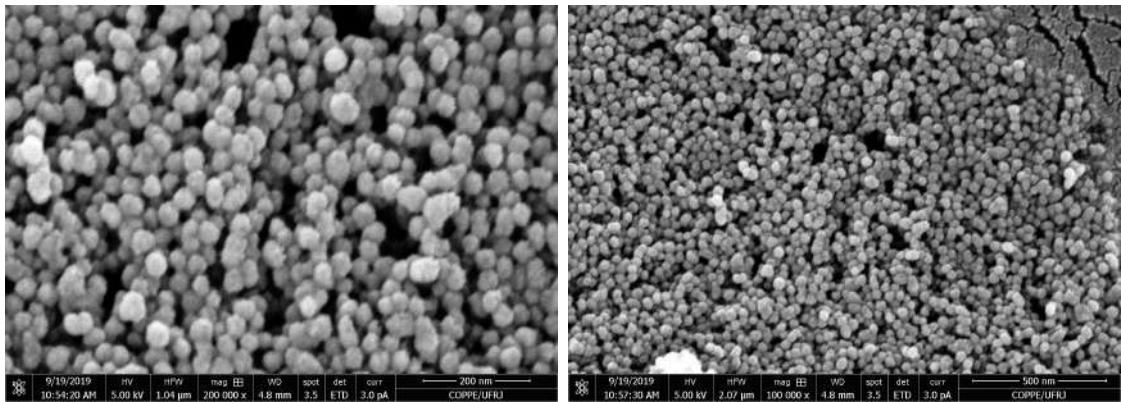


Figura 3.13: Micrografias de MEV do nano-suporte PMDG 25 % com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.

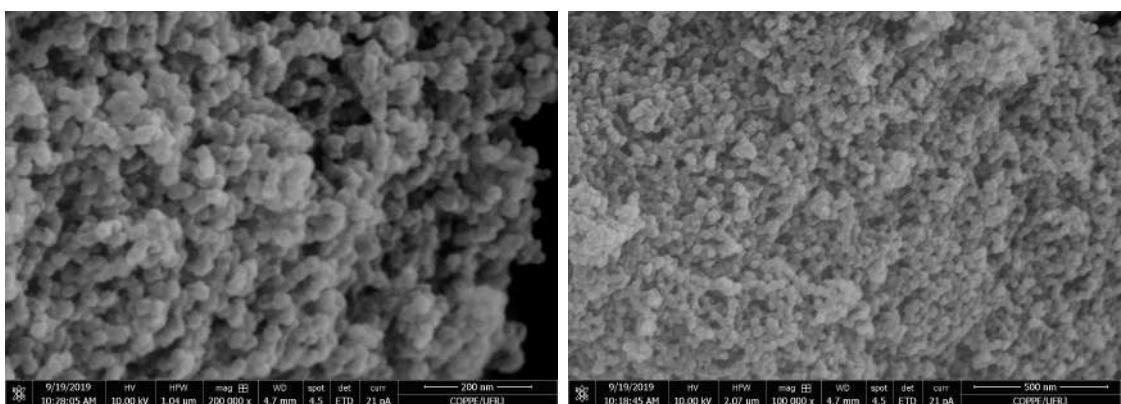


Figura 3.14: Micrografias de MEV do nano-suporte PMDG 50 % com magnificação de A) 200.000x e B) 500.000x.

3.3.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier- FTIR

Para verificar a incorporação dos grupamentos, foi utilizado o espectro do PM como base. A Figura 3.15 apresenta uma comparação dos espectros de FTIR dos nano-suportes produzidos com PMMA e P(MMA-co-DVB), sendo possível verificar a presença das bandas de alongamento C-H do grupo metila (CH_3) e metileno (CH_2) para ambos os espectros. A ocorrência do alongamento simétrico do grupamento CH_3 ocorre em 3000 cm^{-1} e o alongamento C-H assimétrico para o grupamento CH_2 aparece em 2952 cm^{-1} [149].

O grupamento mais importante para ser observado no espectro de PMMA é o grupo funcional éster ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-$). A presença do grupo carbonila pode ser observada na frequência 1729 cm^{-1} , que representa o alongamento mais intenso do espectro [149]. Todas estas bandas também são observadas para o espectro de P(MMA-co-DVB), indicando assim a presença do PMMA nesse nano-suporte [154]. A Figura 3.15, indica também a presença do DVB, como indicado na faixa entre 800 e 842

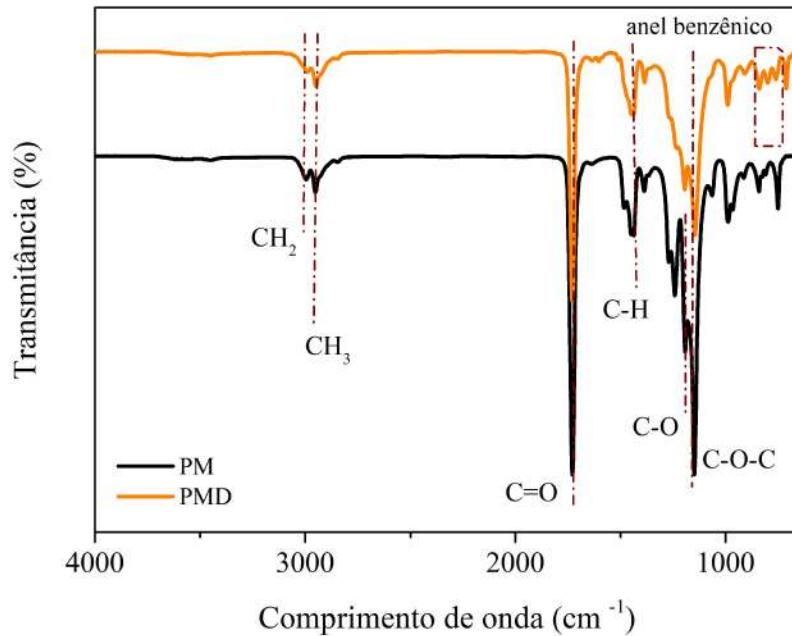


Figura 3.15: Espectros de FTIR para o PMMA e P(MMA-co-DVB).

cm^{-1} , característica da substituição do anel aromático [149].

As Figuras 3.16 e 3.17 comparam os espectros de FTIR dos nano-suportes produzidos com GMA. Basicamente o que diferencia os espectros é a presença do anel epóxido, pois as estruturas moleculares são semelhantes.

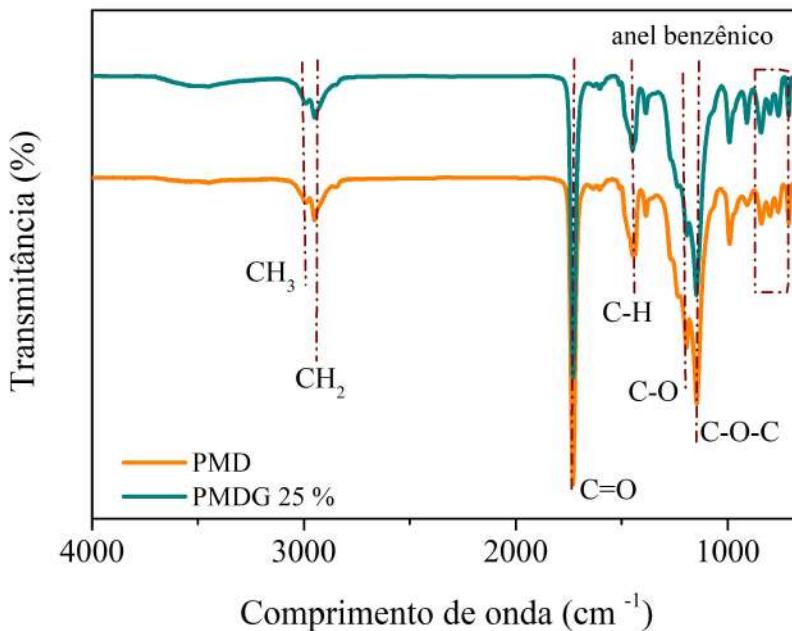


Figura 3.16: Espectros de FTIR do P(MMA-co-DVB) e P(MMA-co-DVB-GMA) 25 %.

Como a maioria dos picos discutidos anteriormente também aparece nos espetros FTIR dos nano-suportes preparados com P(MMA-co-DVB-co-GMA), é possível

observar em particular o aparecimento de um pico característico na banda de absorção 910 cm^{-1} que pode ser atribuído ao alongamento assimétrico do anel epóxido [149].

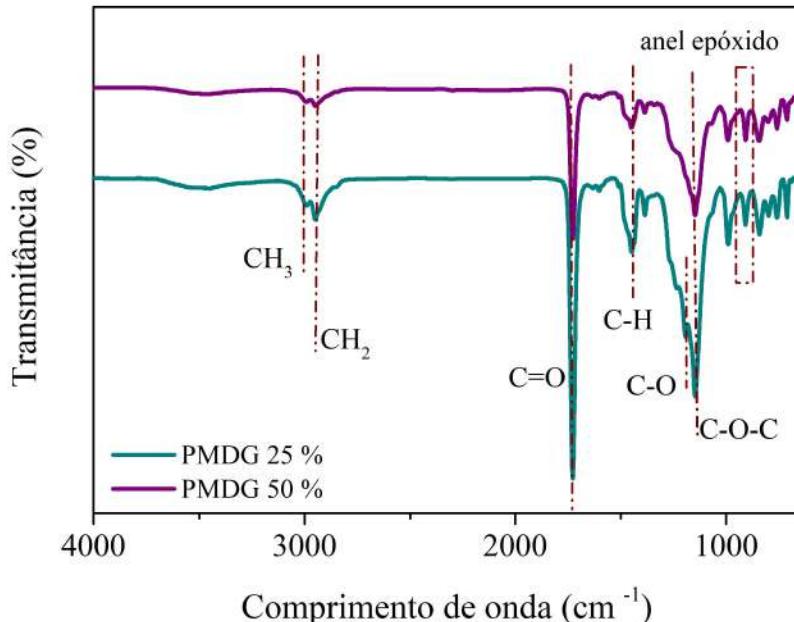


Figura 3.17: Espectros de FTIR do P(MMA-co-DVB) e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 %.

Por fim, foram gerados espectros de correlação (Figura 3.18) para os nano-suportes produzidos e que confirmam que os materiais são distintos, corroborando a incorporação dos diferentes componentes nas estruturas dos polímeros finais obtidos.

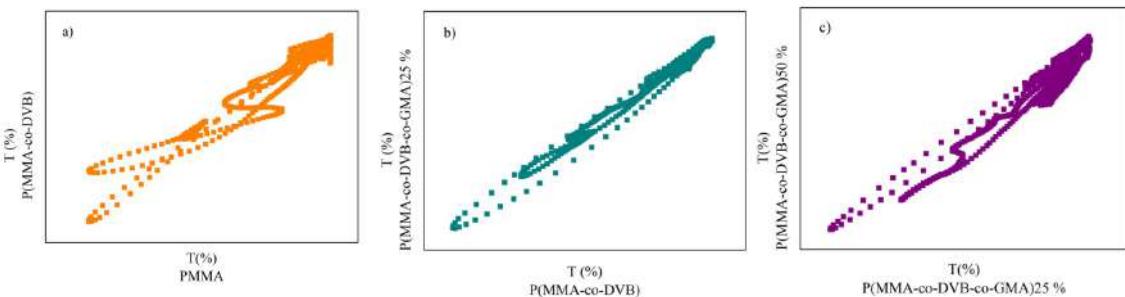


Figura 3.18: Espectros de correlação dos FTIR dos diferentes materiais. a) PM x PMD b) PMD x PMDG 25 % e c) PMDG 25 % x PMDG 50 %

3.3.6 Hidrofobicidade

A Tabela 3.4 mostra os valores do ângulo de contato para os nano-suportes preparados. Dentre eles, o nano-suporte hidrofóbico é o composto PMD, devido à reticulação das cadeias e ao caráter hidrofóbico do DVB. Este monômero apresenta uma solubilidade em água de 5 mg/L [133].

Avaliando a incorporação do comonômero funcional GMA, foi observado que os

materiais produzidos com GMA apresentaram caráter mais hidrofílico. Além disso, a hidrofobicidade ficou mais acentuada com o aumento da concentração de GMA, o aumento no caráter hidrofílico era esperado devido aos grupos funcionais epóxido do GMA e maior solubilidade em água desse monômero. Portanto, é possível atestar os diferentes graus de hidrofobicidade dos suportes obtidos.

Tabela 3.4: Hidrofobicidade dos nanosuportes

Reações	Hidrofobicidade ($^{\circ}$)
PM	61,15 \pm 5,33
PMD	64,13 \pm 4,02
PMDG 25 %	53,31 \pm 1,36
PMDG 50 %	51,10 \pm 1,85

3.3.7 Teste de estabilidade química

Para testar a estabilidade química dos nano-suportes, estes foram submetidos a um teste de solubilidade em THF. Para tanto, 0,015 g de amostras secas foram adicionadas a 3 mL de THF, um bom solvente para todos os materiais aqui relatados. O teste de solubilidade ilustrado na Figura 3.19 mostra que os nano-suportes preparados com DVB não dissolveram em THF. Isso comprova que o DVB provocou a reticulação das cadeias, tornando os materiais insolúveis em solvente orgânicos. Desse modo, as nanopartículas heterofuncionais produzidas têm enorme potencial para uso em processo de imobilização de enzimas, tendo em vista que a baixa solubilidade na presença de solventes orgânicos é fundamental para muitas das aplicações.

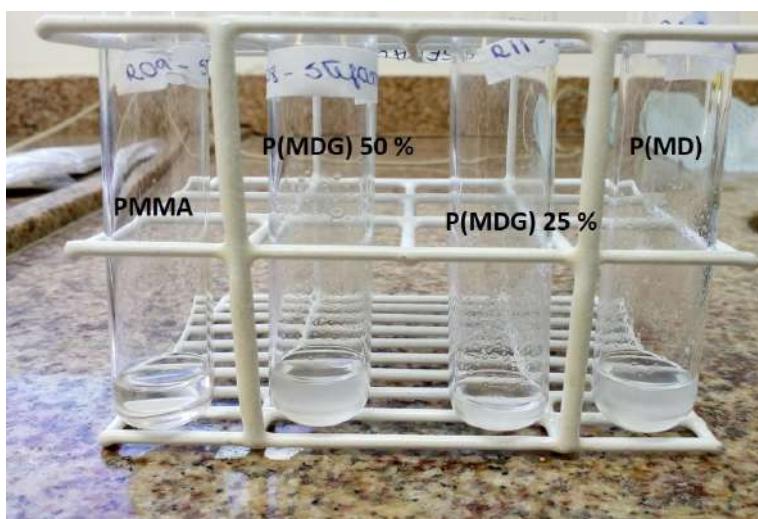


Figura 3.19: Teste de solubilidade de amostras em THF

3.4 Considerações finais

Este trabalho teve a finalidade de preparar diferentes nano-suportes heterofuncionais *in-situ*, por meio da técnica de polimerização, com características específicas de porosidade, morfologia e funcionalidade. Para isto, foi estudada a copolimerização dos monômeros MMA, DVB e GMA.

Constatou-se que os nano-suportes com o grupamento epóxido permitiram obter maiores taxas de reação e maiores rendimentos. Foi observado também o aumento dos tamanhos médios de partícula para maiores concentrações de GMA, o que pode ter resultado da interação entre grupos funcionais presentes nas superfícies das partículas e consequentemente maiores taxas de aglomeração.

Segundo para as propriedades texturais, a adição de GMA causou diminuição das áreas específica, o que pode também ser correlacionado ao aumento dos tamanhos médios das partículas e compactação durante a etapa de secagem. No entanto, na concentração de 25 % de GMA foi verificado maior diâmetro de poro. Certamente, esse diâmetro de poro, que pode favorecer a adsorção da lipase CAL B. Essas propriedades foram confirmadas por análises independentes de MEV, que revelaram a presença de partículas esféricas e estrutura porosa em todos os materiais produzidos, resultante do processo de compactação durante a secagem e da formação de espaços vazios resultantes do mau empacotamento das cadeias por conta da reticulação na presença do DVB.

Constatou-se com o auxílio das análises de FTIR a presença do grupamento epóxido na composição dos nano-suportes (PMDG 25 % e PMDG 50 %), fato importante para aumentar a capacidade de interação com os grupamentos nucleófilos da CAL B. Outro ponto confirmado foi a estabilidade química dos suportes pela adição do agente de reticulação DVB. Por conta da reticulação, todos os copolímeros foram insolúveis no teste de solubilidade em THF. Finalmente, coonfirmou-se o caráter hidrofílico adicionado aos nano-suportes heterofuncionais (PMDG 25 % e PMDG 50 %) pela incorporação do monômero GMA.

Por conta de tudo o que foi aqui discutido, os nano-suportes heterofuncionais (PMDG 25 % e PMDG 50 %) mostram potencial para o uso em imobilizações da lipase CAL B.

Capítulo 4

Imobilização Enzimática nos Nano-suportes

Este capítulo trata da imobilização dos nano-suportes heterofuncionais produzidos no Capítulo II. Na seção 4.1 é apresentado um breve resumo das observações feitas nos Capítulo II e III. Já na seção 4.2 é apresentada a descrição dos materiais e metodologia abordada para a imobilização dos nanosuportes, a qual seguiu o mesmo protocolo adotado no Capítulo II. Os resultados do desempenho dos biocatalisadores nas reações de hidrólise e esterificação são apresentados na seção 4.3. Seguindo, na seção 4.4 é abordado um comparativo entre o desempenho de alguns biocatalisadores do Capítulo II e os nano-suportes heterofuncionais. Na seção 4.5 é apresentado alguns considerações à respeito do desempenho dos nano-suportes nas imobilizações com lipase CAL B.

4.1 Revisão bibliográfica

As lipases podem sofrer ativação na interface água/óleo devido à presença de uma tampa que protege o sítio catalítico, pode ser exposto mediante o contato com uma matriz hidrofóbica. Por isso, o contato da proteína com a superfície é influenciado por fatores como o grau de hidrofobicidade do suporte [7].

A presença da tampa não está necessariamente ligada ao fenômeno de ativação interfacial. Por exemplo, a CAL B não está sujeita a esse fenômeno, embora possua uma tampa que protege seu sítio catalítico. Estudos mostram que a CAL B interage mais com suportes de caráter hidrofóbico e isto tem sido bastante explorado por vários autores [55], [136]. Contudo, suportes hidrofílicos têm também revelado potencial para a realização dessas imobilizações [7].

O uso de nano-suportes poliméricos em biocatálise apresenta vantagens associadas à melhor difusão dos substratos e maximização da área de específica, o que

favorece a incorporação de uma alta carga enzimática. Ademais, estes nano-suportes heterofuncionais apresentam a possibilidade da interação com vários grupos funcionais presentes na superfície, destacando-os dos demais suportes usados para conduzir imobilizações [63], [10], [11].

CAZABAN *et al.* [155] imobilizaram a lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em nanopartículas de sílica heterofuncional para a produção de biodiesel. Os suportes apresentam estabilidade nas reações e conversões em torno de 88 % na produção de ésteres metílicos de ácidos graxos. Comparando com lipase TLL comercial imobilizada os autores CAZABAN *et al.* [155] obtiveram 10 % a mais de rendimento com as nanopartículas de sílica.

A possibilidade de incorporar diferentes funcionalidades em um nano-suporte pode torná-lo mais específico. Com isso, esses suportes oferecem condições para a interação tanto por adsorção física quanto por ligação covalente (com grupamento funcionais das enzima). Portanto, reitera-se aqui a necessidade de realizar estudos que busquem a melhor relação enzima/suporte, pois as características do suporte, as características da enzima e o tipo de imobilização podem afetar o desempenho final do biocatalisador. A Figura 4.1 apresenta a exemplo, como ocorre a imobilização de enzimas em suportes heterofuncionais, a partir da mudança de pH.

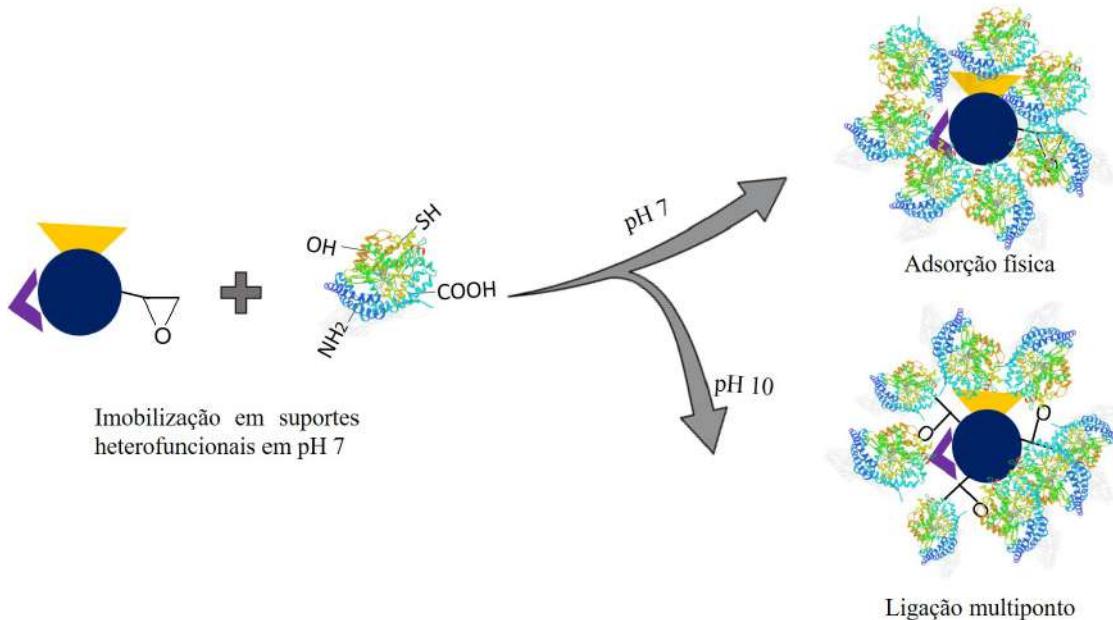


Figura 4.1: Representação esquemática para produção de nanobiocatalisadores a partir de nano-suportes heterofuncionais [2] (Desenho adaptado de [1]).

Nos processos de imobilização, é importante que o tipo de ligação entre a enzima e o suporte seja controlado, pois podem ocorrer problemas decorrentes de alterações na conformação da enzima e dessorção dessa proteína[49]. Por isso, é importante ter algum conhecimento prévio da enzima, tais como a tolerância ao ambiente químico,

grupos funcionais reativos e a presença de regiões hidrofóbicas ou hidrofílicas.

Um estudo prévio apresentado no Capítulo 2 com vários tipos de suporte usados na imobilização da lipase CAL B forneceu informações importantes sobre a natureza, composição química e hidrofobicidade dos polímeros estudados. Ao todo, um grupo de 24 suportes usados para imobilizar a CAL B e testados nas mesmas condições reacionais de hidrólise e esterificação, com o intuito de avaliar o comportamento destes suportes como matrizes em contato com a lipase CAL B. Com os resultados obtidos no Capítulo 2, foi possível estabelecer uma metodologia para obtenção de nano-suportes poliméricos heterofuncionais baseados em fatores como composição química, área específica e grau de hidrofobicidade.

No Capítulo 3 foi apresentado um estudo da síntese para a produção de nano-suportes heterofuncionais, sendo que o grupamento epóxido foi escolhido para a síntese por conta da alta reatividade e interação com os grupamentos nucleófilos da CAL B. Além disso, avaliou-se como a adição do GMA (que possui o grupamento epóxido) afeta propriedades texturais importantes, como a porosidade, tamanho de partícula e morfologia. Os suportes produzidos disponibilizaram alta área específica, porosidade elevada e morfologia esférica.

Este capítulo apresenta resultados relacionados à imobilização da enzima CAL B sobre os nano-suportes à base de PMMA, P(MMA-co-DVB), P(MMA-co-DVB-co-GMA) 25 % e P(MMA-co-DVB-co-GMA) 50 % apresentados no Capítulo 3. As características dos suportes, como área específica, porosidade, a presença do grupo funcional GMA e grau de hidrofobicidade, foram avaliadas na interação com a CAL B. Além disso, foi avaliada a atividade desses nano-suportes nas reações de hidrólise e esterificação.

4.2 Materiais e metodologia

4.2.1 Enzima

A enzima utilizada na imobilização dos nano-suportes foi a Lipozyme[®] CAL B, Lipase *Candida antarctica* do tipo B no estado solúvel fornecida pela empresa *Nozozymes*.

4.2.2 Suportes

A Tabela 3.1 apresenta os nano-suportes sintetizados no Capítulo 3 e utilizado nas imobilizações.

4.2.3 Reagentes

A Tabela 4.1 apresenta a lista de reagentes utilizados com e respectivos fornecedores.

Tabela 4.1: Descrição dos reagentes utilizados nos ensaios de imobilização por adsorção física.

Reagentes	Pureza (%)	Fornecedor
Acetona	≥ 99	Synth
Acetonitrila	≥ 99	Sigma-Aldrich
Ácido oléico	≥ 99	Synth
Dimetilsulfóxido	≥ 99	Sigma-Aldrich
Etanol	≥ 99	Synth
Fosfato de sódio monobásico	≥ 99	Synth
Hidróxido de sódio	≥ 99	Vetec Química Fina
p-nitrofenil laurato	≥ 99	Sigma-Aldrich

4.2.4 Processo de imobilização por adsorção física

O método utilizado para imobilização foi a adsorção física, segundo os protocolos propostos por PINTO *et al.* [61], PINTO *et al.* [86] e que estão detalhados a seguir.

O primeiro passo foi preparar uma solução primária contendo a lipase CAL B em tampão fosfato 5 mM. Em seguida alíquotas de 10 mL desta solução eram retiradas, equivalentes a uma carga enzimática de 176 U/g. Por fim, as soluções eram postas em contato com 1g dos nano-suportes secos e agitadas a 36 rpm por 24 h. Com a finalidade de acompanhar a curva cinética de imobilização durante o processo, alíquotas de 150 µL foram retiradas do sobrenadante nos tempos de amostragem iguais a 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 24 h.

Ao término das imobilizações os biocatalisadores foram filtrados e lavados com tampão fosfato de sódio (5 mM e pH 7) para garantir a neutralidade do meio. Concluída a lavagem, os biocatalisadores foram condicionados na geladeira (18 °C) para posterior avaliação de desempenho nas reações de hidrólise e esterificação.

4.2.5 Cinética de imobilização

A construção da curva cinética de imobilização baseou-se na quantificação de enzimas ainda presentes no sobrenadante, por meio da hidrólise do substrato (*p*-PNL).

A reação hidrolítica foi acompanhada no espectrofotômetro (UV-1800 modelo, fornecido pela Shimadzu) através da mudança de coloração do substrato, já que a ação catalítica da lipase origina um produto de cor amarelada que pode ser quantificado mediante a absorção no comprimento de onda 412 nm. O aumento da concentração do produto formado é observado por meio da intensidade de absorção nesta

região por volume de solução enzimática ($\delta A/\delta T$), com auxílio da Lei Lambert-Beer [87].

A reação hidrolítica foi realizada por meio da adição de 2,2 mL de tampão fosfato de sódio (25 mM e pH 7) e 0,25 mL de substrato em uma cubeta de vidro. Em seguida, a cubeta foi inserida no espectrofotômetro e deu-se início à leitura do equipamento. Posteriormente, e após o registro da linha de base da leitura, adicionaram-se 20 μ L do sobrenadante. Para o cálculo de atividade hidrolítica do sobrenadante foi utilizada Equação 4.1,

$$A_{hidro} = \frac{\alpha V_f f}{V_e} \quad (4.1)$$

em que:

A_{hidro} :atividade hidrolítica (UI/mL);

α : corresponde ao coeficiente angular da reta (absorbância/min);

V_f : volume final do meio reacional (mL);

f : fator de correlação obtido pela curva de calibração do p-nitrofenol em tampão fosfato de 25 mM a 30 °C;

V_e : volume de sobrenadante (enzima) adicionado ao meio reacional (mL).

Ao final, foi possível obter a atividade hidrolítica (UI/mL) em (UI/g_{suporte}), pois o valor em (UI/mL) foi multiplicado por um fator conversão de unidades igual a 10 e dividido pela massa de suporte. Esse valor reflete a quantidade necessária de enzima para catalisar a formação de 1 μ mol de produto (p-nitrofenol) por minuto.

4.2.6 Rendimento

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado como a diferença entre a atividade hidrolítica da solução enzimática antes da imobilização (A_i) e a atividade hidrolítica após o processo de imobilização (A_f). A Equação 4.2 apresenta o valor de RI, dado como uma porcentagem do valor inicial de A_i ,

$$RI(\%) = \frac{A_i - A_f}{A_i} 100 \quad (4.2)$$

sendo:

A_i é a atividade enzimática da solução no início da imobilização (UI/g);

A_f é atividade verificada após as 24 h de imobilização.

4.2.7 Reação de hidrólise

A atividade hidrolítica foi determinada com auxílio da hidrólise do (*p*-NPL) em um tampão fosfato (25 mM e pH 7), tendo como produto o *p*-nitrofenol. A reação ocorreu em um cubeta monitorada por espectrofotômetro (UV-1800 modelo, fornecido

pela Shimadzu), utilizando um comprimento de onda 412 nm. Inicialmente foram adicionados 0,01 g de biocatalisadores (enzima já imobilizada) à cubeta que continha 2,2 mL de tampão e 250 μ L do substrato. A leitura teve duração de 8 min, sendo que a cubeta sofria uma leve agitação de 10 em 10 segundos para a homogeneização do meio. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de p-NPL por minuto em pH 7 a 30 °C. A Equação 4.3 apresenta o cálculo de atividade enzimática da reação de hidrólise para a enzima imobilizado ao suporte A_{hidro} (UI/g),

$$A_{hidro} = \frac{\alpha V_f f}{M_b} \quad (4.3)$$

sendo:

α : corresponde ao coeficiente angular da reta (absorbância/min);

V_f : volume final do meio reacional (mL);

f : fator de correlação obtido pela curva de calibração do p-nitrofenol em tampão 25 mM a 30 °C;

M_b : massa de biocatalisador (g).

4.2.8 Reação de esterificação

A reação de esterificação do ácido oléico com etanol razão molar de 1:1 (etanol : ácido oléico) foi iniciada com a adição de 0,2 g de biocatalisador ao meio reacional que continha 4,5 mL de ácido oléico e 0,827 mL de etanol, em um reator aberto, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (45 °C). O tempo de reação foi de 24 h, mantido sob agitação moderada de uma agitador magnético. Nos tempos de amostragem de 15, 30, 45 e 120 minutos foram retiradas alíquotas para o cálculo da atividade de esterificação.

A atividade de esterificação foi gerada por meio do monitoramento do consumo de ácido oléico (ou a formação em μ moles de oleato de etila) por minuto. A Equação 4.4 apresenta o cálculo usado para caracterizar a atividade de esterificação, caracterizado pelo consumo de NaOH (0,08 M) durante a titulação.

$$A_{ester} = \frac{1000(V_{NaOH0} - V_{NaOHT})C_{NaOH}V_f}{V_e t M_e} \quad (4.4)$$

em que:

$V_{(NaOH0)}$: é o volume hidróxido de sódio (NaOH) gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL);

$V_{(NaOHT)}$: é o volume hidróxido de sódio (NaOH) gasto na titulação das amostras nos tempos t (mL);

$C_{(NaOH)}$: molaridade da solução de NaOH (mol/L);

V_f : volume final do meio reacional (mL);

V_e : volume de alíquota retirada do meio reacional para titulação (mL);

t: tempo (min);

M_e : massa de biocatalisador usado na reação (g).

4.3 Resultados

A Tabela 4.2 apresenta os resultados dos testes realizados com os nano-suportes (PM e PMD) e os nano-suportes heterofuncionais (PMDG 25 % e PMDG 50 %) utilizados na imobilização da lipase CAL B. Primeiramente, são apresentado os dados de área específica e grau de hidrofobicidade, como discutido no Capítulo 3, para referência e embasamento da discussão proposta.

Tabela 4.2: Parâmetros obtidos para os nanobiocatalisadores com carga inicial enzimática de 176 U/g. A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, A_{hidro} = atividade de hidrólise e A_{ester} = atividade de esterificação.

Amostra	A_{esp} (m^2/g)	G_{hidro} (°)	R_{imob} (%)	A_{hidro} (U/g _{bioc})	A_{ester} (U/g _{bioc})
PM	70	61 ± 5	72	1	39
PMD	110	64 ± 4	99	11	50
PMDG 25 %	91	53 ± 1	98	9	254
PMDG 50 %	80	51 ± 2	98	4	218

Os rendimentos de imobilização apresentados na Tabela 4.2 Tabela 4.2 mostram que os nano-suportes preparados na presença de DVB imobilizaram praticamente 100 % da enzima disponível. Além disso, os dados mostram que a menor área específica e a hidrofobicidade não parecem ser os fatores determinantes para explicar o baixo desempenho relativo do PMMA em relação aos demais suportes. Afinal, o PMMA tem hidrofobicidade intermediária entre os materiais produzidos e praticamente 90 % da área superficial do suporte PMDG 50 %. Portanto, a natureza química da superfície do suporte parece ser também fator relevante para explicar os dados obtidos. Dados semelhantes foram obtidos por GUISAN *et al.* [120] ao imobilizar *Escherichia coli* em suportes comerciais baseados em epóxido.

Os valores de atividade de hidrólise para os nano-suportes não foram tão expressivos quanto as atividades de esterificação, porque a CAL B não é caracterizada por desempenhos excepcionalmente bons na hidrólise. É possível ainda observar a forte influência da área específica nos desempenhos dos nanobiocatalisadores na hidrólise. Conforme a área específica dos suportes aumenta, aumenta também a atividade hidrolítica. Essa análise parece indicar que a redução da área específica dificultou a difusão da substrato até a enzima. Outros autores também já relataram a influência de fatores difusionais para explicar a atividade de hidrólise promovida por enzimas

suportadas [65].

A Tabela 4.2 também mostra a conversão do ácido oléico em oleato de etila, analisada com auxílio da atividade de esterificação. De acordo com a Tabela 4.2, os nano-suportes heterofuncionais (PDGM 25 % e PDGM 50 %) permitiram obter um desempenho superior na esterificação, quando comparados aos demais suportes. Evidentemente, não foi possível observar uma relação direta entre o grau de hidrofobicidade e atividade desempenhada por esses nanobiocatalisadores. Este resultado confirma observações de outros autores JIN *et al.* [88] e IDRIS e BUKHARI [22] de que a CAL B não apresenta fenômeno relevante de ativação interfacial e que esta ativação depende da interação com o suporte, que por sua vez depende das propriedades do suporte.

De acordo com o estudo de MATEO *et al.* [118], após 24 h de imobilização foi possível obter um percentual de 10 a 20 % de grupamentos epóxidos envolvidos na imobilização. Acredita-se que o grupamento epóxido consegue estabelecer algumas ligações covalentes em pH neutro, desde que anteriormente tenha sido realizada uma adsorção física. Portanto, pode ser inferido que esses suportes heterofuncionais epoxídicos hidrofílicos (PMGD 25 % e PMGD 55 %) tenham realizado algumas ligações covalentes com a enzima durante o processo de adsorção física no pH neutro, antes mesmo de ocorrer uma mudança para o pH básico. Com a ocorrência dessas ligações, pode ter sido possível obter um aprisionamento mais efetivo da CAL B, não alterando a conformação da enzima e deixando o sítio ativo livre para o substrato. Trata-se de um problema que, no entanto, deve ser analisado com mais profundidade no futuro próximo.

Deve-se ressaltar que o monômero GMA é um componente dispendioso que os demais monômeros utilizados. Dessa forma, o conjunto de dados mostra o nanobiocatalisador com 25 % de GMA pode ser considerado como o mais promissor, pois não seria necessária uma quantidade grande para obter um biocatalisador com alto rendimento de imobilização e excelente desempenho nas atividades de esterificação.

A Figura 4.2 apresenta as cinéticas de imobilização da CAL B sobre os nano-suportes (PM, PMD, PMDG 25 % e PMDG 50 %). Os dados gerados para a construção das curvas correspondem às quantidades residuais da CAL B no sobre-nadante ao longo das 24 h. A cinética de imobilização foi sempre muito rápida, pois após 30 min de reação a quantidade enzima imobilizada no suporte atingiu em todos os casos mais de 80 %. Outro resultado importante é que as altas áreas específicas dos nano-suportes com que eles adsorvessem praticamente toda a carga enzimática inicial, minimizando a importância de outras variáveis sobre o processo, como no caso do grau de hidrofobicidade. Apenas o nano-suporte à base de PMMA não imobilizou toda a quantidade de enzima disponível no início do processo. Essa menor capacidade de adsorção do PMMA foi discutida no Capítulo 3 com o auxílio

da análise de fisissorção, que mostrou que esse suporte esta sujeito a saturação rápida dos poros, como consequência de serem pequenos. Com isto, possivelmente a quantidade de enzima tenha saturado os poros.

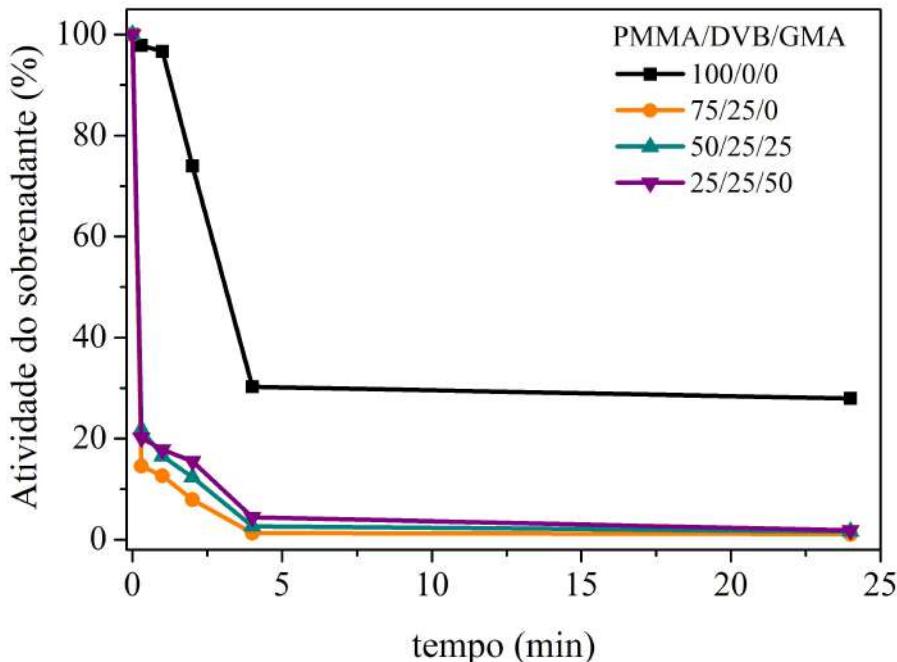


Figura 4.2: Cinéticas de imobilização da CAL B sobre os nano-suportes preparados.

Finalmente, as Figuras 4.3 e 4.4 mostram os gráficos de hidrofobicidade *versus* atividade de hidrólise e esterificação, respectivamente. Como comentado anteriormente, esses gráficos não mostram a influência do grau de hidrofobicidade nas atividades desempenhadas pelos biocatalisadores. Pelo contrário, é possível notar que os suportes heterofuncionais hidrofílicos apresentaram melhores desempenhos. Com base nesses gráficos e nas discussões propostas, evidentemente propriedades como a área específica, a porosidade e a composição química constituem fatores de extrema relevância para explicar o desempenho final de um biocatalisador, e não apenas a hidrofobicidade ou a intensidade da interação hidrofóbica com o suporte.

4.4 Comparações entre os biocatalisadores

Uma comparação dos desempenhos observados para os biocatalisadores estudados no Capítulo 2 e 4 é apresentada na Tabela 4.3. Para isso, foram selecionados 2 biocatalisadores de cada grupo com os melhores desempenhos na atividade de esterificação. Do primeiro grupo constituído por suportes com baixa área específica destacaram-se P(MMA-co-DEAEMA)60-40 % e R65. No segundo grupo composto de suportes comerciais, destacaram-se o Poly 7 e Accurel. Finalmente, no terceiro grupo formado pelos nano-suportes preparados no Capítulo 3, destacaram-se os

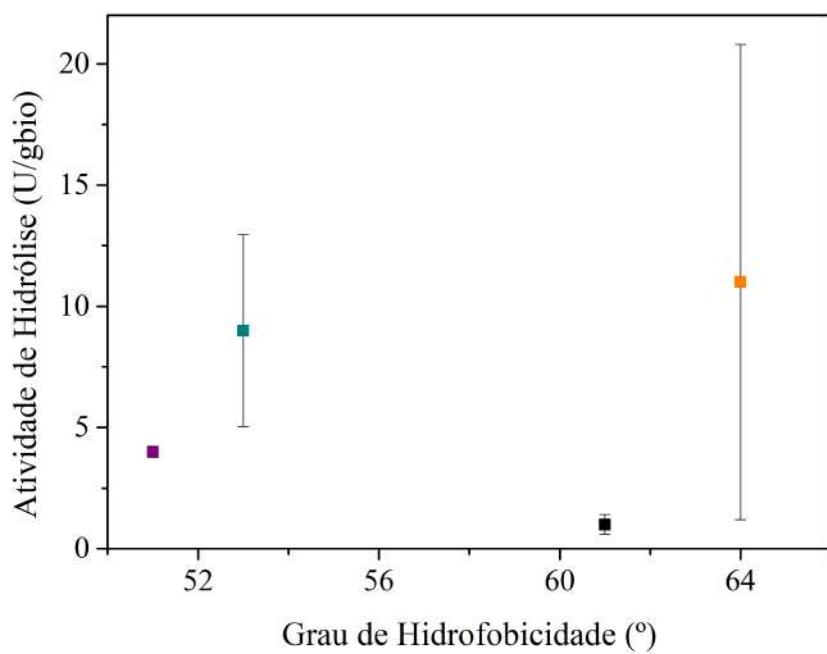


Figura 4.3: Relação entre grau de hidrofobicidade e atividade de hidrólise para os biocatalisadores preparados.

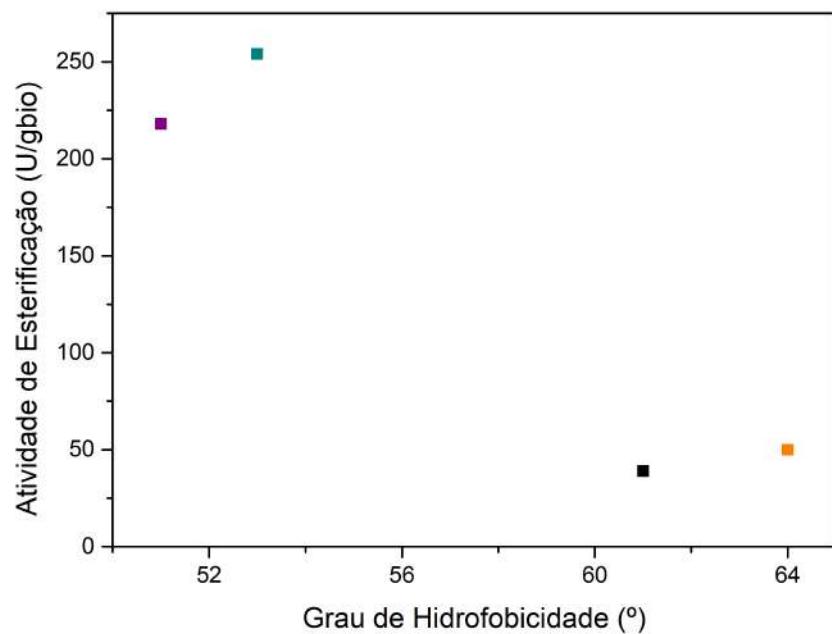


Figura 4.4: Relação entre grau de hidrofobicidade e atividade de esterificação para os biocatalisadores preparados.

nano-suportes PDGM 25 % e PDGM 50 %.

Nesse contexto, os suportes descritos na Tabela 4.3 apresentam diferentes ca-

Tabela 4.3: Parâmetros obtidos para os nanobiocatalisadores. A_{esp} = área específica, R_{imob} = rendimento de imobilização, G_{hidro} = grau de hidrofobicidade, $A_{t_{hidro}}$ = atividade de hidrólise e $A_{t_{ester}}$ = atividade de esterificação.

Amostra	A_{esp} (m ² /g)	G_{hidro} (°)	R_{imob} (%)	A_{ester} (U/g _{bioc})	A_{ester}/ A_{esp} (U/m ²)
P(MMA-co-DEAEMA)60-40 %	0	63	51	296	0
R65	0	96	98	268	0
Poly 7	86	95	97	348	4
Accurel	27	95	6	130	5
PMDG 25 %	91	53	98	254	3
PMDG 50 %	80	51	98	218	3

racterísticas quanto a área específica e ao grau de hidrofobicidade. Em termos de rendimento de imobilização, a maior parte dos suportes apresentaram bom desempenho, com ressalva para o P(MMA-co-DEAEMA) e Accurel, que levaram a rendimentos de imobilização muito baixos, o que provavelmente pode ser creditado às relativamente baixas áreas específicas. No caso do Accurel, como esse material é constituído essencialmente por polipropileno expandido, a ausência de grupos funcionais polares pode também explicar a menor interação da enzima com o suporte (ref).

Com relação às atividades de esterificação, nota-se que os suportes do Capítulo 2 tiveram um desempenho relativamente melhor, embora todos tenham apresentado atividade superior a 200 U/g_{bio}, com exceção do Accurel. É possível observar que o suporte R65 interage fortemente com a enzima por interações hidrofóbicas, já que este material possui baixa área específica e a maior concentração de enzima se encontra na superfície e em posições favoráveis à exposição do sítio catalítico. Como consequência, esse tipo de interação não provoca mudanças na conformação da enzima e parece justificar por que o suporte R65 mostrou atividades pronunciadas. Este mesmo efeito, foi observado por PINTO *et al.* [61] ao estudar a imobilização da CAL B em partículas casca-núcleo, quando obtiveram elevadas atividades hidrolíticas com alguns núcleos que não exibiam porosidade.

O mesmo aconteceu para o suporte de baixa área específica P(MMA-co-DEAEMA), embora nesse caso seja possível que o grupo da amina terciária do PDEAEMA tenha realizado algumas ligações covalentes com a enzima. Decerto, o átomo de nitrogênio do grupamento PDEAEMA é mais reativo que o átomo de oxigênio tendo a capacidade de doar seu par de elétrons com maior rapidez. Em resumo, essas duas com baixa área superficial R65 e P(MMA-co-DEAEMA) permitiram melhores desempenhos que os nanosuportes heterofuncionais. Contudo, o

uso dos nano-suportes pode permitir o aumento da carga de enzimas, enquanto que provavelmente os suportes de baixa área específica já estejam saturados de enzima. Essa hipótese deverá ser testada no futuro próximo.

Para comparar de outra forma os desempenhos dos suportes heterofuncionais e dos suportes comerciais, a atividade de esterificação foi dividida pela área específica de cada um dos suportes para uma melhor visualização dessas atividades. Apesar do Accurel ter proporcionado uma atividade de esterificação menor que dos outros suportes, quando essa atividade é dividida pela área específica ele apresenta a maior atividade por área imobilizada de biocatalisador dentre todos os suportes. É importante enfatizar que os resultados obtidos para os nano-suportes heterofuncionais não ficaram muitos distinos dos demais suportes de forma que alguns ajustes podem ser feitos nas condições de preparo para melhorar ainda mais o desempenho desses nanobiocatalisadores.

4.5 Considerações finais

Esse capítulo tratou da imobilização da lipase CAL B nos nano-suportes apresentados no Capítulo 3. Primeiramente, constatou-se a alta capacidade de carga desses nano-suportes por meio das rápidas cinéticas de adsorção da lipase CAL B, que levaram a rendimentos de imobilização superiores a 90 %. Além disso, notou-se a influência da área específica destes materiais nas atividades de hidrólise, havendo aumento da atividade hidrolítica com o aumento de área específica, o que possivelmente indica a existência de resistências difusionais para o substrato. Na reação de esterificação constatou-se melhores desempenhos dos nano-suporte heterofuncionais que continham GMA, em relação aos nano-suportes convencionais que não continham grupamentos epóxido. Finalmente, foi observado desempenho competitivo dos nano-suportes preparados, em relação a suportes comerciais, embora algumas características dos nano-suportes possam ainda ser melhoradas por meio da otimização do conteúdo de GMA e das condições de preparo.

Capítulo 5

Conclusões

Com base no estudo realizado no presente trabalho, que realizou a imobilização da CAL B em 28 suportes, constatou-se não haver uma relação direta entre o grau de hidrofobicidade dos suportes e o aumento das atividades de hidrólise e de esterificação em imobilizações com a lipase CAL B. Dessa forma, ficou caracterizada a forte influência da composição da superfície do suporte sobre a intensidade das interações enzima/suporte.

Com base na síntese dos novos biocatalisadores funcionais propostos, também foi possível constatar que a adição do grupamento epóxido por meio do monômero GMA provocou aumento no tamanho médio das partículas devido a sua alta reatividade, que ocasionou maior interação entre os grupamento epóxido de diferentes partículas, promovendo a aglomeração. Além disso, consequentemente houve contribuições desse monômero tanto no aumento do volume quanto no aumento do diâmetro de poros. Deve-se também considerar que os nano-suportes produzidos na presença de DVB foram insolúveis em THF, por conta da estabilidade química e porosidade conferidas pelas reações de reticulação..

Com base em ensaios de imobilização da lipase CAL B nesses nano-suportes, foi observada a alta capacidade de carga dessas matrizes, as quais adsorveram em menos de 5 h quase 100 % de enzima. Especificamente sobre o desempenho da atividade de hidrólise, a área específica mostrou grande influência no aumento de atividade por conta da provável existência de resistência difusional do substrato. No que diz respeito à atividade de esterificação, os suportes heterofuncionais (PMDG 25 % e PMDG 50 %) estabeleceram melhores ligações com a enzima, fazendo com que fossem obtidos resultados significativos na conversão do oleato de etila, quando comparado com os resultados obtidos como os nano-suportes convencionais preparados sem GMA.

Algumas ressalvas precisam ser feitas quanto ao processo de secagem por meio da liofilização, que provocou uma agregação entre as partículas o que pode eventualmente afetar o desempenho desses materiais na preparação de biocatalisadores. É

preciso desenvolver uma técnica de secagem e recuperação das partículas que preserve a distribuição de tamanhos original das partículas preparadas na polimerização em emulsão.

De forma geral, o estudo mostrou que hidrofobicidade não é o único fator determinante na escolha de um suporte, mas o conjunto de propriedades do material, dentre as quais devem ser destacadas a porosidade, a área específica, a estabilidade química, e os grupos funcionais presentes na superfície dos suportes. Como mostrado no presente trabalho, apesar da lipase ser uma enzima lipofílica, suportes mais hidrofílicos podem levar a desempenhos de imobilização e catálise melhores que suportes menos hidrofílicos, por conta do balanço de propriedades e características desses materiais.

Por fim, os nano-suportes desenvolvidos nesse trabalho contribuíram para ampliar o conjunto de suportes disponíveis na literatura, introduzindo materiais mais hidrofílicos com GMA para produzir uma nova classe de biocatalisadores.

5.1 Trabalhos futuros

- Estudos sobre a capacidade de saturação dos nanosuportes P(MMA-co-DVB-co- GMA) 25 % GMA;
- Estudos envolvendo os ciclos de reuso desses nanobiocatalisadores;
- Estudos explorando a composição P(MMA-co-DVB-co- GMA) 25 % em outras técnicas de polimerização para produzir devem ser conduzidos;
- Aprofundar o estudo dos fenômenos interfaciais existentes na interação enzima/suporte.

Referências Bibliográficas

- [1] “ACE Inhibitor”. Disponível em: (<https://skfb.ly/6W6vB>). Acesso em: 05 maio 2021, 2021.
- [2] MATEO, C., GRAZU, V., PALOMO, J. M., et al. “Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports”, *Nature Protocols*, v. 2, n. 5, pp. 1022–1033, 2007.
- [3] WOHLGEMUTH, R. “Biocatalysis–Key enabling tools from biocatalytic one-step and multi-step reactions to biocatalytic total synthesis”, *New Biotechnology*, v. 60, pp. 113–123, 2021.
- [4] DE MARÍA, P. D. “Biocatalysis, sustainability, and industrial applications: Show me the metrics”, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, p. 100514, 2021.
- [5] CAO, Y., LI, X., GE, J. “Enzyme Catalyst Engineering toward the Integration of Biocatalysis and Chemocatalysis”, *Trends in Biotechnology*, 2021.
- [6] PALMER, T., BONNER, P. L. *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*. Elsevier, 2007.
- [7] MATEO, C., GRAZÚ, V., PESSELA, B., et al. “Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization”, *Biochemical society transactions*, v. 35, n. 6, pp. 1593–1601, 2007.
- [8] SHELDON, R. A., VAN PELT, S. “Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how”, *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, pp. 6223–6235, 2013.
- [9] SANTOS, J. C. S. D., BARBOSA, O., ORTIZ, C., et al. “Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes”, 2015.
- [10] BILAL, M., FERNANDES, C. D., MEHMOOD, T., et al. “Immobilized lipases-based nano-biocatalytic systems—A versatile platform with incredible biotechnological potential”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021.

- [11] CIPOLATTI, E. P., VALERIO, A., HENRIQUES, R. O., et al. “Nanomaterials for biocatalyst immobilization—state of the art and future trends”, *RSC advances*, v. 6, n. 106, pp. 104675–104692, 2016.
- [12] MIN, K., YOO, Y. J. “Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 19, n. 4, pp. 553–567, 2014.
- [13] HE, C., CAI, P., LI, J., et al. “Blood-brain barrier-penetrating amphiphilic polymer nanoparticles deliver docetaxel for the treatment of brain metastases of triple negative breast cancer”, *Journal of Controlled Release*, v. 246, pp. 98–109, 2017.
- [14] DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M. D. G., SOLDI, V. “Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros”, *Química Nova*, v. 27, n. 4, pp. 623–630, 2004.
- [15] GOMES, A. F. M. “Nanopartículas lipídicas como transportadores de fármacos para o sistema nervoso central”, 2016.
- [16] ABDOLLAHI, A., ROGHANI-MAMAQANI, H., SALAMI-KALAJAHI, M. “Morphology evolution of functionalized styrene and methyl methacrylate copolymer latex nanoparticles by one-step emulsifier-free emulsion polymerization”, *European Polymer Journal*, v. 133, pp. 109790, 2020.
- [17] OZCICEK, I., AYSIT, N., CAKICI, C., et al. “The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution”, *Materials Science and Engineering: C*, p. 112308, 2021.
- [18] MOSNÁČKOVÁ, K., KOLLÁR, J., HUANG, Y.-S., et al. “Synthesis routes of functionalized nanoparticles”. In: *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles*, Elsevier, pp. 1–46, 2019.
- [19] MATEO, C., GRAZU, V., PALOMO, J. M., et al. “Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports”, *Nature Protocols*, v. 2, n. 5, pp. 1022, 2007.
- [20] BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C., et al. “Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties”, *Biomacromolecules*, v. 14, n. 8, pp. 2433–2462, 2013.

- [21] KIRK, O., CHRISTENSEN, M. W. “Lipases from candida a ntarctica: unique biocatalysts from a unique origin”, *Organic Process Research & Development*, v. 6, n. 4, pp. 446–451, 2002.
- [22] IDRIS, A., BUKHARI, A. “Immobilized Candida antarctica lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis”, *Biotechnology advances*, v. 30, n. 3, pp. 550–563, 2012.
- [23] LI, C., TAN, T., ZHANG, H., et al. “Analysis of the conformational stability and activity of Candida antarctica lipase B in organic solvents: insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 37, pp. 28434–28441, 2010.
- [24] ALNOCH, R. C., ALVES DOS SANTOS, L., MARQUES DE ALMEIDA, J., et al. “Recent trends in biomaterials for immobilization of lipases for application in non-conventional media”, *Catalysts*, v. 10, n. 6, pp. 697, 2020.
- [25] FIOMARKETS. “Lipase Market by Source (Animal Lipases, Microbial Lipases), Application(Animal Feed, Bakery,Dairy, Confectionery, Others), Region, Global Industry Analysis, Market Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2021 to 2028”. Disponível em: <https://www.fiomarkets.com/report/lipase-market-by-source-animal-lipases-microbial-lipases-419242.html>. Acesso em: 05 maio 2021, 2021.
- [26] PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C. R., et al. “The realm of microbial lipases in biotechnology”, *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 29, n. 2, pp. 119–131, 1999.
- [27] PAQUES, F. W., MACEDO, G. A. “Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais”, *Química Nova*, v. 29, n. 1, pp. 93–99, 2006.
- [28] CASTILHO, L. “Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells”, *Fortschritt-Berichte VDI Reihe*, v. 17, 2001.
- [29] PETERSEN, M. T. N., FOJAN, P., PETERSEN, S. B. “How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution”, *Journal of biotechnology*, v. 85, n. 2, pp. 115–147, 2001.
- [30] BORNSCHEUER, U. T. “Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis”, *FEMS microbiology reviews*, v. 26, n. 1, pp. 73–81, 2002.

- [31] DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. *Química de alimentos de Fennema*. Artmed Editora, 2018.
- [32] VERGER, R. “Interfacial activation’of lipases: facts and artifacts”, *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 1, pp. 32–38, 1997.
- [33] CASTRO, H. F. D., MENDES, A. A., SANTOS, J. C. D., et al. “Modificação de óleos e gorduras por biotransformação”, *Química Nova*, v. 27, n. 1, pp. 146–156, 2004.
- [34] BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., et al. “A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase”, *Nature*, v. 343, n. 6260, pp. 767–770, 1990.
- [35] SCHRAG, J. D., LI, Y., WU, S., et al. “Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*”, *Nature*, v. 351, n. 6329, pp. 761–764, 1991.
- [36] JAEGER, K.-E., REETZ, M. T. “Microbial lipases form versatile tools for biotechnology”, *Trends in biotechnology*, v. 16, n. 9, pp. 396–403, 1998.
- [37] REIS, P., HOLMBERG, K., WATZKE, H., et al. “Lipases at interfaces: a review”, *Advances in colloid and interface science*, v. 147, pp. 237–250, 2009.
- [38] PLEISS, J., FISCHER, M., SCHMID, R. D. “Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site”, *Chemistry and physics of lipids*, v. 93, n. 1-2, pp. 67–80, 1998.
- [39] UPPENBERG, J., HANSEN, M. T., PATKAR, S., et al. “The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*”, *Structure*, v. 2, n. 4, pp. 293–308, 1994.
- [40] SILVESTRINI, L., CIANCI, M. “Principles of lipid–enzyme interactions in the limbus region of the catalytic site of *Candida antarctica* Lipase B”, *International journal of biological macromolecules*, v. 158, pp. 358–363, 2020.
- [41] MARGESIN, R., SCHINNER, F. *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms: With 65 Figures and 45 Tables*. Springer Science & Business Media, 1999.
- [42] UPPENBERG, J., OEHRNER, N., NORIN, M., et al. “Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a

- stereospecificity pocket for secondary alcohols”, *Biochemistry*, v. 34, n. 51, pp. 16838–16851, 1995.
- [43] LUAN, B., ZHOU, R. “A novel self-activation mechanism of *Candida antarctica* lipase B”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 19, n. 24, pp. 15709–15714, 2017.
- [44] PALOMO, J. M., ORTIZ, C., FUENTES, M., et al. “Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions”, *Journal of Chromatography A*, v. 1038, n. 1-2, pp. 267–273, 2004.
- [45] PALOMO, J. M., ORTIZ, C., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., et al. “Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties”, *Enzyme and microbial technology*, v. 36, n. 4, pp. 447–454, 2005.
- [46] MARTINELLE, M., HOLMQUIST, M., HULT, K. “On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, v. 1258, n. 3, pp. 272–276, 1995.
- [47] PUNEKAR, N. “Enzymes: Their place in biology”. In: *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*, Springer, pp. 3–4, 2018.
- [48] MINTEER, S. D. *Enzyme stabilization and immobilization*. Springer, 2017.
- [49] SOUZA, L. T., VERÍSSIMO, L. A., PESSELA, B. C., et al. “Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte”, 2017.
- [50] BRADY, D., JORDAAN, J. “Advances in enzyme immobilisation”, *Biotechnology letters*, v. 31, n. 11, pp. 1639–1650, 2009.
- [51] ADLERCREUTZ, P. “Immobilisation and application of lipases in organic media”, *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, pp. 6406–6436, 2013.
- [52] JESIONOWSKI, T., ZDARTA, J., KRAJEWSKA, B. “Enzyme immobilization by adsorption: A review”, *Adsorption*, v. 20, n. 5-6, pp. 801–821, 2014.
- [53] PALOMO, J. M., MUÑOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., et al. “Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19, pp. 279–286, 2002.

- [54] BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISEN, P., et al. “A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports”, *Biotechnology and bioengineering*, v. 58, n. 5, pp. 486–493, 1998.
- [55] CABRERA, Z., FERNANDEZ-LORENTE, G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., et al. “Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, n. 1-4, pp. 171–176, 2009.
- [56] FERNANDEZ-LORENTE, G., CABRERA, Z., GODOY, C., et al. “Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties”, *Process Biochemistry*, v. 43, n. 10, pp. 1061–1067, 2008.
- [57] REIS, C. L. B., SOUSA, E. Y. A. D., SERPA, J. D. F., et al. “Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities”, *Química Nova*, v. 42, n. 7, pp. 768–783, 2019.
- [58] FURLANI, I. L., AMARAL, B. S., OLIVEIRA, R. V., et al. “Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise”, *Química Nova*, v. 43, n. 4, pp. 463–473, 2020.
- [59] MATEO, C., ABIAN, O., BERNEDO, M., et al. “Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, n. 4, pp. 456–462, 2005.
- [60] VESCOVI, V., KOPP, W., GUISÁN, J. M., et al. “Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-glutaraldehyde spacer arms”, *Process Biochemistry*, v. 51, n. 12, pp. 2055–2066, 2016.
- [61] PINTO, M. C., FREIRE, D. M., PINTO, J. C. “Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*”, *Molecules*, v. 19, n. 8, pp. 12509–12530, 2014.
- [62] PINTO, M. C. C. “Desenvolvimento de suportes enzimáticos por polimerização simultânea em suspensão e emulsão”, 2017.
- [63] PINTO, M. C., CIPOLATTI, E. P., MANOEL, E. A., et al. “Production of New Functionalized Polymer Nanoparticles and Use for Manufacture

of Novel Nanobiocatalysts”, *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 305, n. 6, pp. 2000065, 2020.

- [64] PINTO, M. C., EVERTON, S. S., CIRILO, L. C., et al. “Effect of hydrophobicity degree of polymer particles on lipase immobilization and on biocatalyst performance”, *Biocatalysis and Biotransformation*, pp. 1–11, 2020.
- [65] MILETIĆ, N., VUKOVIĆ, Z., NASTASOVIĆ, A., et al. “Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile immobilization supports for biocatalysts”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, n. 4, pp. 196–201, 2009.
- [66] SHELDON, R. A., BASSO, A., BRADY, D. “New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy”, *Chemical Society Reviews*, 2021.
- [67] DALKIRAN, B., ERDEN, P. E., KILIÇ, E. “Graphene and tricobalt tetraoxide nanoparticles based biosensor for electrochemical glutamate sensing”, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, v. 45, n. 2, pp. 340–348, 2017.
- [68] FERNANDEZ-LAFUENTE, R. “Enzyme immobilization 2016”. 2017.
- [69] AGHAEI, H., YASINIAN, A., TAGHIZADEH, A. “Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on epoxy-activated cloisite 30B as a new heterofunctional carrier and its application in the synthesis of banana flavor and production of biodiesel”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 178, pp. 569–579, 2021.
- [70] ZHAO, J., MA, M., YAN, X., et al. “Immobilization of lipase on β -cyclodextrin grafted and aminopropyl-functionalized chitosan/Fe₃O₄ magnetic nanocomposites: An innovative approach to fruity flavor esters esterification”, *Food Chemistry*, v. 366, pp. 130616–130616, 2021.
- [71] CIPOLOTTI, E. P., VALÉRIO, A., HENRIQUES, R. O., et al. “Production of new nanobiocatalysts via immobilization of lipase B from *C. antarctica* on polyurethane nanosupports for application on food and pharmaceutical industries”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, pp. 2957–2963, 2020.
- [72] FERNANDES, K. V., CAVALCANTI, E. D., CIPOLOTTI, E. P., et al. “Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase”, *Catalysis Today*, v. 362, pp. 122–129, 2021.

- [73] DE MELLO, M. C. S., VILLARDI, H. G. D., YOUNG, A. F., et al. “Life cycle assessment of biodiesel produced by the methylic-alkaline and ethylic-enzymatic routes”, *Fuel*, v. 208, pp. 329–336, 2017.
- [74] AVHAD, M. R., MARCETTI, J. M. “Uses of enzymes for biodiesel production”. In: *Advanced bioprocessing for alternative fuels, biobased chemicals, and bioproducts*, Elsevier, pp. 135–152, 2019.
- [75] CIPOLATTI, E. P., PINTO, M. C. C., ROBERT, J. D. M., et al. “Pilot-scale development of core–shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 135, n. 40, pp. 46727, 2018.
- [76] MANOEL, E. A., PINTO, M., DOS SANTOS, J. C., et al. “Design of a core–shell support to improve lipase features by immobilization”, *RSC advances*, v. 6, n. 67, pp. 62814–62824, 2016.
- [77] WANCURA, J. H., FANTINEL, A. L., UGALDE, G. A., et al. “Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations”, *Journal of Cleaner Production*, v. 285, pp. 124838, 2021.
- [78] ANDRADE, T. A., MARTÍN, M., ERRICO, M., et al. “Biodiesel production catalyzed by liquid and immobilized enzymes: Optimization and economic analysis”, *Chemical Engineering Research and Design*, v. 141, pp. 1–14, 2019.
- [79] ENZYMOCORE. “Biodiesel Enzymatic Process”. Disponível em: <https://enzymocore.com/about-us/>. Acesso em: 10 maio 2021, 2021.
- [80] BESTETI, M. D., CUNHA, A. G., FREIRE, D. M., et al. “Core/S hell Polymer Particles by Semibatch Combined Suspension/E mulSION Polymerizations for Enzyme Immobilization”, *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 299, n. 2, pp. 135–143, 2014.
- [81] PAIVA, T. F., ALVES, J. B., MELO, P. A., et al. “Development of smart polymer microparticles through suspension polymerization for treatment of schistosomiasis”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 13, n. 6, pp. 1900028, 2019.
- [82] DE ARAÚJO, N. A., PINTO, J. C., CALDEIRA, A. B., et al. “Synthesis and Characterization of Binders for Propellants”. In: *Macromolecular Symposia*, v. 383, p. 1800062. Wiley Online Library, 2019.

- [83] DE S. MIRANDA, L., NELE, M., PINTO, J. C. “Production of polymer particles loaded with corrosion inhibitor for applications in oil wells”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 13, n. 6, pp. 1900027, 2019.
- [84] DA SILVA DUTRA, L., COSTA, T. D. S. B., LOBO, V. T. V., et al. “Preparation of polymer microparticles through non-aqueous suspension polycondensations: part III—degradation of PBS microparticles in different aqueous environments”, *Journal of Polymers and the Environment*, v. 27, n. 1, pp. 176–188, 2019.
- [85] BUTT, H.-J., GRAF, K., KAPPL, M. *Physics and chemistry of interfaces*. John Wiley & Sons, 2013.
- [86] PINTO, M. C. C., DE SOUZA E CASTRO, N. L., CIPOLOTTI, E. P., et al. “Effects of reaction operation policies on properties of core–shell polymer supports used for preparation of highly active biocatalysts”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 13, n. 1, pp. 1800055, 2019.
- [87] SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning, 2017.
- [88] JIN, Q., JIA, G., ZHANG, Y., et al. “Hydrophobic surface induced activation of *Pseudomonas cepacia* lipase immobilized into mesoporous silica”, *Langmuir*, v. 27, n. 19, pp. 12016–12024, 2011.
- [89] FARADAY, M. “X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light”, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, , n. 147, pp. 145–181, 1857.
- [90] SANDERS, W. C. *Basic principles of nanotechnology*. CRC Press, 2018.
- [91] RAHMAN, M., REBROV, E. V., OTHERS. “Microreactors for gold nanoparticles synthesis: from Faraday to flow”, *Processes*, v. 2, n. 2, pp. 466–493, 2014.
- [92] FEYNMAN, R. P. “There’s plenty of room at the bottom”, *California Institute of Technology, Engineering and Science magazine*, 1960.
- [93] SCHULZ, P. A. “Há mais história lá embaixo—um convite para rever uma palestra”, *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 40, n. 4, 2018.
- [94] HUNT, G., MEHTA, M. *Nanotechnology: "Risk, Ethics and Law"*. Routledge, 2013.

- [95] KROTO, H. W., HEATH, J. R., O'BRIEN, S. C., et al. “C60: Buckminsterfullerene”, *nature*, v. 318, n. 6042, pp. 162–163, 1985.
- [96] IIJIMA, S. “Helical microtubules of graphitic carbon”, *nature*, v. 354, n. 6348, pp. 56–58, 1991.
- [97] KHMELNITSKY, Y. L., NEVEROVA, I., MOMTCHEVA, R., et al. “Surface-modified polymeric nanogranules containing entrapped enzymes: a novel biocatalyst for use in organic media”, *Biotechnology techniques*, v. 3, n. 4, pp. 275–280, 1989.
- [98] ANSARI, S. A., HUSAIN, Q. “Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review”, *Biotechnology advances*, v. 30, n. 3, pp. 512–523, 2012.
- [99] AN, J., LI, G., ZHANG, Y., et al. “Recent Advances in Enzyme-Nanostructure Biocatalysts with Enhanced Activity”, *Catalysts*, v. 10, n. 3, pp. 338, 2020.
- [100] BOSLEY, J., PEILOW, A. “Immobilization of lipases for use in non-aqueous reaction systems. Methods in Nonaqueous Enzymology. Edited by: Gupta MN”. 2000.
- [101] JIA, H., ZHU, G., WANG, P. “Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility”, *Biotechnology and bioengineering*, v. 84, n. 4, pp. 406–414, 2003.
- [102] JANG, S., KIM, D., CHOI, J., et al. “Trypsin immobilization on mesoporous silica with or without thiol functionalization”, *Journal of Porous Materials*, v. 13, n. 3-4, pp. 385–391, 2006.
- [103] BERNAL, C., ILLANES, A., WILSON, L. “Heterofunctional hydrophilic–hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: application to lactulose palmitate synthesis”, *Langmuir*, v. 30, n. 12, pp. 3557–3566, 2014.
- [104] WANG, M., MOHANTY, S. K., MAHENDRA, S. “Nanomaterial-supported enzymes for water purification and monitoring in point-of-use water supply systems”, *Accounts of chemical research*, v. 52, n. 4, pp. 876–885, 2019.
- [105] KREUTER, J. “Nanoparticles—a historical perspective”, *International journal of pharmaceutics*, v. 331, n. 1, pp. 1–10, 2007.

- [106] RAO, J. P., GECKELER, K. E. “Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters”, *Progress in polymer science*, v. 36, n. 7, pp. 887–913, 2011.
- [107] VU, K. B., PHUNG, T. K., TRAN, T. T., et al. “Polystyrene nanoparticles prepared by nanoprecipitation: A recyclable template for fabricating hollow silica”, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2021.
- [108] KÄNKÄNEN, V., SEITSONEN, J., TUOVINEN, H., et al. “Evaluation of the effects of nanoprecipitation process parameters on the size and morphology of poly (ethylene oxide)-block-polycaprolactone nanostructures”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 590, pp. 119900, 2020.
- [109] GUO, Y., LIU, Q., PENG, C., et al. “Colloid silica nanoparticles trapped morphology of polymer blends during solvent evaporation”, *European Polymer Journal*, v. 107, pp. 164–172, 2018.
- [110] SOUTO, E. B., SEVERINO, P., SANTANA, M. H. A. “Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II”, *Polímeros*, v. 22, n. 1, pp. 101–106, 2012.
- [111] NORAKANKORN, C., PAN, Q., REMPEL, G. L., et al. “Synthesis of core/shell structure of glycidyl-functionalized poly (methyl methacrylate) latex nanoparticles via differential microemulsion polymerization”, *European polymer journal*, v. 45, n. 11, pp. 2977–2986, 2009.
- [112] KIMMINS, S. D., WYMAN, P., CAMERON, N. R. “Amine-functionalization of glycidyl methacrylate-containing emulsion-templated porous polymers and immobilization of proteinase K for biocatalysis”, *Polymer*, v. 55, n. 1, pp. 416–425, 2014.
- [113] SONAWANE, M. D., NIMSE, S. B. “Surface modification chemistries of materials used in diagnostic platforms with biomolecules”, *Journal of Chemistry*, v. 2016, 2016.
- [114] DUNCAN, R., VICENT, M. J. “Polymer therapeutics-prospects for 21st century: the end of the beginning”, *Advanced drug delivery reviews*, v. 65, n. 1, pp. 60–70, 2013.
- [115] AHMED, S. A., WAHAB, W. A. A., ABDEL-HAMEED, S. A. “Comparative study in kinetics and thermodynamic characteristics of immobilized caseinase on novel support from basalt by physical adsorption and covalent binding”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 18, pp. 101028, 2019.

- [116] MATEO, C., ABIAN, O., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., et al. “Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, n. 7, pp. 509–515, 2000.
- [117] MELO, R. R. D., ALNOCH, R. C., VILELA, A. F. L., et al. “New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: a tool for enzyme immobilization at neutral pH”, *Molecules*, v. 22, n. 7, pp. 1088, 2017.
- [118] MATEO, C., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., ABIAN, O., et al. “Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage”, *Biomacromolecules*, v. 1, n. 4, pp. 739–745, 2000.
- [119] MATEO, C., GRAZÚ, V., PESSELA, B., et al. “Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization”, *Biochemical society transactions*, v. 35, n. 6, pp. 1593–1601, 2007.
- [120] GUISAN, J. M., BOLIVAR, J. M., LÓPEZ-GALLEGO, F., et al. *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols*. Springer, 2020.
- [121] HERNANDEZ, K., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. “Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance”, *Enzyme and microbial technology*, v. 48, n. 2, pp. 107–122, 2011.
- [122] LI, K., FAN, Y., HE, Y., et al. “Burkholderia cepacia lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis”, *Scientific reports*, v. 7, n. 1, pp. 1–17, 2017.
- [123] BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C., et al. “Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*”, *Process Biochemistry*, v. 47, n. 8, pp. 1220–1227, 2012.
- [124] BOLIVAR, J. M., MATEO, C., GRAZU, V., et al. “Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports”, *Process Biochemistry*, v. 45, n. 10, pp. 1692–1698, 2010.
- [125] YUST, M. D. M., PEDROCHE, J., ALAIZ, M., et al. “Partial purification and immobilization/stabilization on highly activated glyoxyl-agarose supports

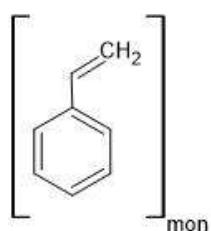
- of different proteases from flavourzyme”, *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 16, pp. 6503–6508, 2007.
- [126] RUEDA, N., DOS SANTOS, J., TORRES, R., et al. “Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Glyoxyl Agarose Supports: Improved Stability and Prevention of the Enzyme Desorption”, *Methods in enzymology*, v. 571, pp. 73–85, 2016.
- [127] ZAAK, H., SASSI, M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. “A new heterofunctional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes: Application to the stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*”, *Process Biochemistry*, v. 64, pp. 200–205, 2018.
- [128] XU, F., ZHU, Y., CHAI, M., et al. “Comparison of ethanolamine/ethylenediamine-functionalized poly (glycidyl methacrylate) for efficient gene delivery”, *Acta biomaterialia*, v. 7, n. 8, pp. 3131–3140, 2011.
- [129] TURKOVA, J., BLÁHA, K., MALANIKOVA, M., et al. “Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3–12”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, v. 524, n. 1, pp. 162–169, 1978.
- [130] ZHANG, X., WANG, Y., ZHONG, T., et al. “Optimal spacer arm micro-environment for the immobilization of recombinant Protein A on heterofunctional amino-epoxy agarose supports”, *Process Biochemistry*, v. 91, pp. 90–98, 2020.
- [131] CARVALHO, T., PEREIRA, A. D. S., BONOMO, R. C., et al. “Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowia lipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020.
- [132] HERNÁNDEZ-ORTIZ, J., VIVALDO-LIMA, E. “Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing”. 2013.
- [133] LOVELL, P. A., SCHORK, F. J. “Fundamentals of emulsion polymerization”, *Biomacromolecules*, v. 21, n. 11, pp. 4396–4441, 2020.
- [134] EL-HOSHOUDY, A. N. M. B. “Emulsion Polymerization Mechanism”, *Recent Research in Polymerization*, p. 1, 2018.

- [135] GHARIEH, A., KHOEE, S., MAHDAVIAN, A. R. “Emulsion and mini-emulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics”, *Advances in colloid and interface science*, v. 269, pp. 152–186, 2019.
- [136] CUNHA, A. G., BESTETI, M. D., MANOEL, E. A., et al. “Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from Candida antarctica: effect of the support nature on catalytic properties”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 100, pp. 59–67, 2014.
- [137] SAJJADI, S. “Control of particle size by feed composition in the nanolatexes produced via monomer-starved semicontinuous emulsion copolymerization”, *Journal of colloid and interface science*, v. 445, pp. 174–182, 2015.
- [138] AHMAD, H., ISLAM, A., HOSSAIN, M. A., et al. “Emulsion copolymerization of hydrophobic and hydrophilic monomers: an experimental study with styrene and 2-hydroxyethyl methacrylate”, *e-Polymers*, v. 6, n. 1, 2006.
- [139] PATIL, M. T., LAKSHMINARASIMHAN, S., SANTHOSH, G. “Optical and thermal studies of host Poly (methyl methacrylate)(PMMA) based nanocomposites: A review”, *Materials Today: Proceedings*, 2021.
- [140] MANE, S., PONRATHNAM, S., CHAVAN, N. “Synthesis and characterization of hypercrosslinked hydroxyl functionalized co-polymer beads”, *European polymer journal*, v. 59, pp. 46–58, 2014.
- [141] BAYRAMOGLU, G., TUNALI, Y., ARICA, M. Y. “Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor”, *Catalysis Communications*, v. 8, n. 7, pp. 1094–1101, 2007.
- [142] LIU, H., LIU, J., TAN, B., et al. “Covalent immobilization of Kluyveromyces fragilis β -galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide”, *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 35, n. 8, pp. 1287–1295, 2012.
- [143] SONG, X.-J., HU, J., WANG, C.-C. “Synthesis of highly surface functionalized monodispersed poly (St/DVB/GMA) nanospheres with soap-free emulsion polymerization followed by facile “click chemistry” with functionalized alkylthiols”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 380, n. 1-3, pp. 250–256, 2011.

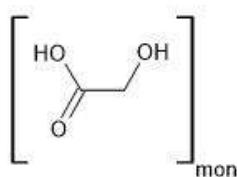
- [144] PECORA, R. “Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids”, *Journal of nanoparticle research*, v. 2, n. 2, pp. 123–131, 2000.
- [145] CONDON, J. B. *Surface Area and Porosity Determinations by Physisorption: Measurement, Classical Theories and Quantum Theory*. Elsevier, 2019.
- [146] SING, K., EVERETT, D., HAUL, R., et al. “Reporting physisorption data for gas/solid systems, IUPAC commission on colloid and surface chemistry including catalysis”, *Pure Appl. Chem*, v. 57, pp. 603, 1985.
- [147] HODOROABA, V.-D., UNGER, W., SHARD, A. *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles*. Elsevier, 2019.
- [148] SMITH, B. C. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. CRC press, 1998.
- [149] STUART, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. J. Wiley & Sons, 2004.
- [150] UPADHYAYA, S., DOHARE, R. K., AGARWAL, M., et al. “Kinetic Study of PMMA Synthesis by Batch Emulsion Polymerization”, *Oriental Journal of Chemistry*, v. 28, n. 1, pp. 565, 2012.
- [151] MANE, S., PONRATHNAM, S., CHAVAN, N. “Effect of chemical cross-linking on properties of polymer microbeads: A review”, *Can Chem Trans*, v. 3, n. 4, pp. 473–485, 2015.
- [152] SCHMAL, M. *Heterogeneous catalysis and its industrial applications*. Springer, 2016.
- [153] GREGG, S., SING, K. *Adsorption, surface area, and porosity*. Academic Press Inc, 1982.
- [154] SUGUMARAN, D., KARIM, K. J. A. “Removal of copper (II) ion using chitosan-graft-poly (methyl methacrylate) as adsorbent”, *eProceedings Chemistry*, v. 2, n. 1, 2017.
- [155] CAZABAN, D., ILLANES, A., WILSON, L., et al. “Bio-inspired silica lipase nanobiocatalysts for the synthesis of fatty acid methyl esters”, *Process Biochemistry*, v. 74, pp. 86–93, 2018.

Apêndice A

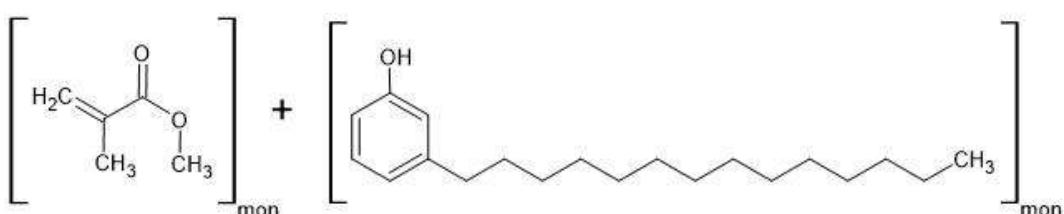
**Estrutura química dos monômeros
utilizados na produção de cada
suporte**



Estireno

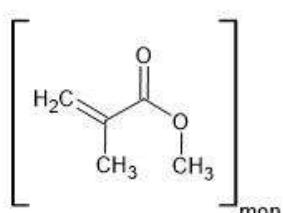


Ácido glicólico

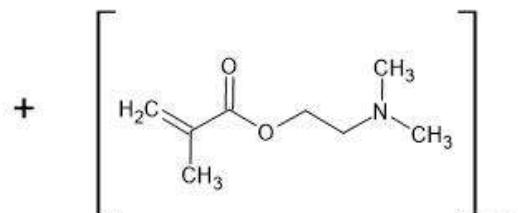


Metacrilato de Metila

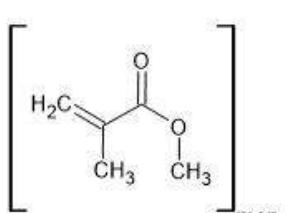
Cardanol



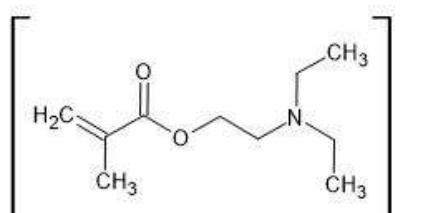
Metacrilato de Metila



DMAEMA



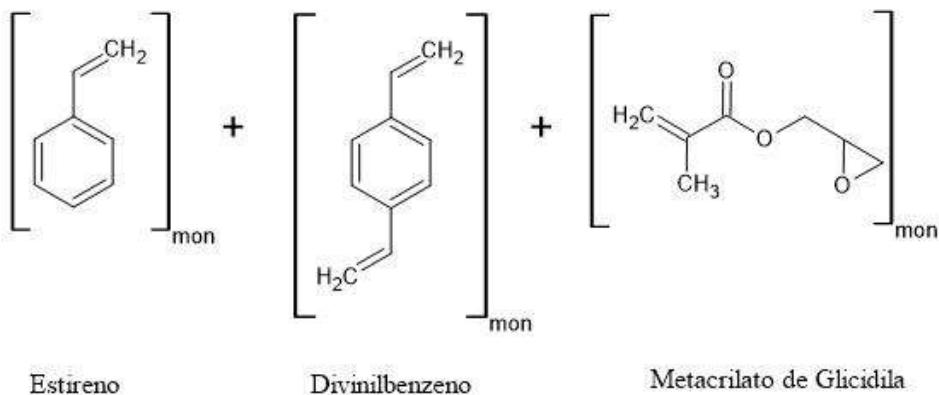
Metacrilato de Metilo



DEAEMA

Figura A.1: Suportes usados nas immobilizações

DO1

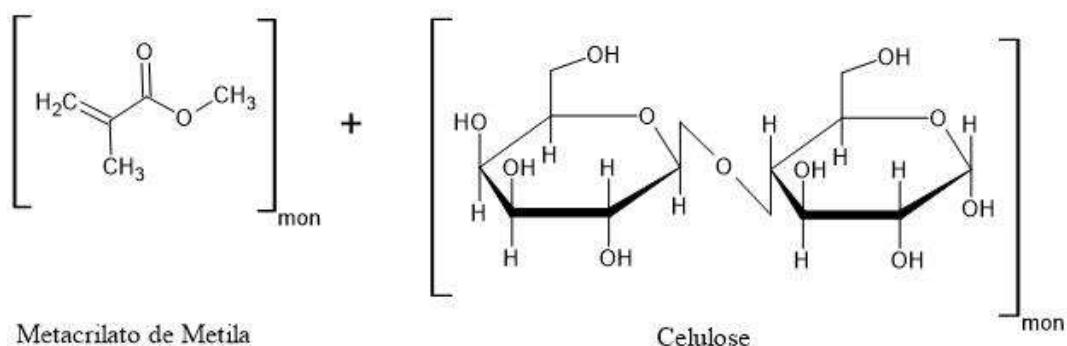


Estireno

Divinilbenzeno

Metacrilato de Glicidila

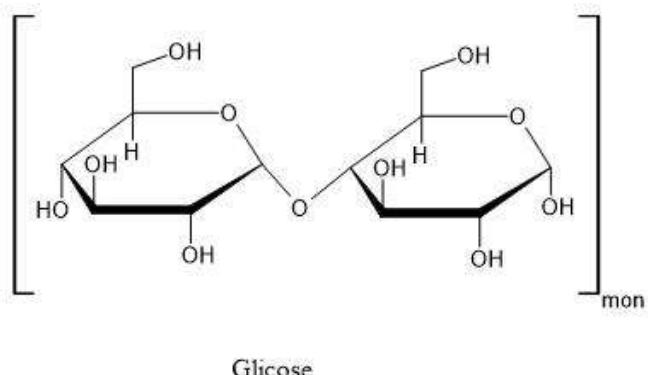
NCC/NCF



Metacrilato de Metila

Celulose

NL12



Glicose

Figura A.2: Suportes usados nas imobilizações.

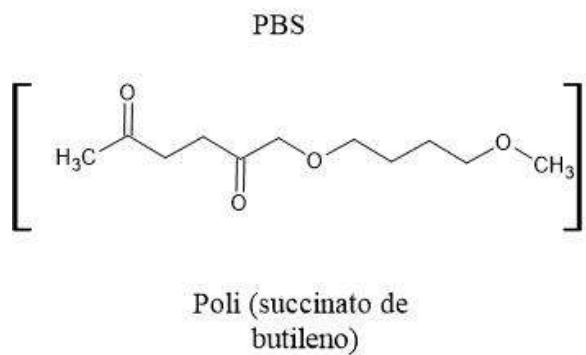
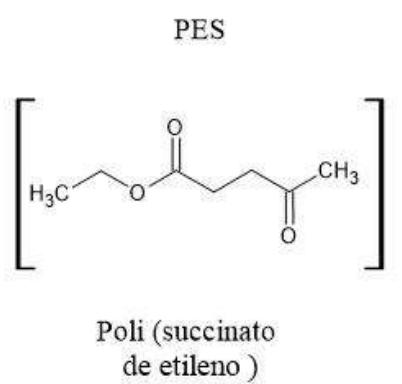
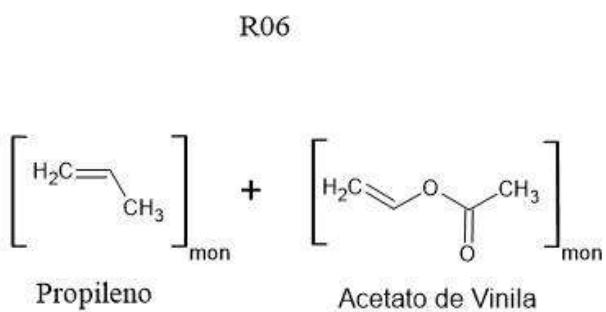
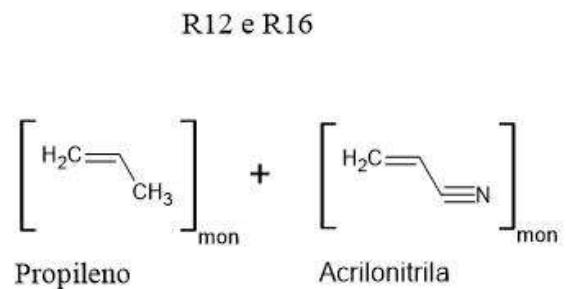


Figura A.3: Suportes usados nas imobilizações.