

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza – CCMN

Instituto de Química

Projeto Final de Curso de Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas

Síntese de Suportes Poliméricos para Imobilização da Lipase B de *Candida antarctica*

Leilane Carla Matos Cirilo

Orientador(es): Denise Maria Guimarães Freire

José Carlos Costa da Silva Pinto

Rio de Janeiro

Março de 2013

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO

TÍTULO: SÍNTESE DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica*

ALUNA: Leilane Carla Matos Cirilo

ORIENTADORES: Denise Maria Guimarães Freire, DBQ – Instituto de Química - UFRJ

José Carlos Costa da Silva Pinto, PEQ – COPPE – UFRJ

A utilização de enzimas imobilizadas (biocatalisadores) em processos biotecnológicos tem crescido com o passar dos anos devido a fatores como, possibilidade de aumento da estabilidade dessa proteína, poderem ser utilizadas em processos contínuos e a capacidade destas serem reutilizadas. Com isso, visando avaliar a influência da hidrofobicidade dos suportes na imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) foram preparadas partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo utilizando a técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão. Foi observado que alterando a composição da casca é possível obter partículas poliméricas com diferentes polaridades e propriedades morfológicas (áreas específicas, diâmetro de poro, volume de poro) que podem ser utilizadas na imobilização da CAL-B, uma vez que esta apresenta o fenômeno da ativação interfacial quando em contato com superfícies hidrofóbicas em ambiente com baixa força iônica. Os parâmetros de imobilização e o desempenho da enzima imobilizada foram avaliados frente as reações de hidrólise do p-nitrofenil laurato e de esterificação de ácido oleico em meio alcóolico. Enzimas imobilizadas em suportes com maior caráter hidrofóbico apresentaram maiores atividades de esterificação embora estes foram os suportes que possuíram menores rendimentos de imobilização (poli(estireno-co-DVB)/PS e PS/PS). Já as enzimas imobilizadas em suportes com maior caráter hidrofílico, apresentaram maiores atividades de hidrólise e maiores eficiências de imobilização e retenção de atividade. Concluiu-se que a atividade da enzima imobilizada está relacionada à interação entre os efeitos difusionais, que levam à diminuição da atividade das enzimas imobilizadas, juntamente com as características das partículas poliméricas utilizadas como suportes e as características do meio reacional (polaridade do meio).

Palavras-chave: imobilização, CAL-B, partícula casca-núcleo, polimerização simultânea.

# Índice

Lista de Figuras .....	v
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Equações.....	x
1. Introdução .....	1
1.1. Mecanismos e Sistemas de Polimerização .....	2
1.2. Polimerização em Suspensão via Radicais Livres.....	4
1.2.1. Fatores que Influenciam a Distribuição dos Tamanhos de Partículas (DTP) .....	4
1.2.2. Iniciador .....	6
1.2.3. Efeito Gel.....	6
1.3. Polimerização em Emulsão .....	6
1.3.1. Iniciador .....	7
1.3.2. Emulsificante .....	8
1.3.3. Aditivos.....	8
1.3.4. Mecanismo da Polimerização em Emulsão .....	8
1.3.5. Fatores que Influenciam a Distribuição dos Tamanhos das Partículas .....	9
1.4. Síntese de Partículas Casca-Núcleo a partir da Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão.....	10
1.5. Lipases.....	12
1.5.1. Fatores que Afetam a Atividade das Lipases .....	13
1.5.2. Lipase B de <i>Candida antarctica</i> .....	13
1.6. Imobilização de Lipases .....	13
1.6.1. Imobilização por Adsorção .....	15
1.6.2. Imobilização por Ligação Covalente em uma Matriz .....	15
1.6.3. Imobilização por Encapsulamento (ou Oclusão) .....	15
1.6.4. Imobilização por Ligação Cruzada Intermolecular.....	16
1.7. Fatores que Influenciam na Perda de Atividade da Enzima Após Imobilização.....	16
1.7.1. Efeito Conformacional.....	16

1.7.2.	Efeitos Estéricos.....	16
1.7.3.	Efeitos Difusionais.....	17
1.7.4.	Efeitos Hidrofóbicos.....	17
1.8.	Comentários Finais.....	17
2.	Objetivo.....	19
3.	Materiais e Métodos.....	20
3.1.	Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão.....	20
3.1.1.	Materiais.....	20
3.1.2.	Reagentes.....	21
3.1.3.	Metodologia Experimental.....	22
3.1.3.1.	Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão.....	22
3.1.3.2.	Polimerização em Massa.....	25
3.2.	Técnicas de Caracterização das Partículas Poliméricas.....	26
3.2.1.	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	26
3.2.2.	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	28
3.2.3.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	29
3.2.4.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30
3.2.5.	Microscopia Óptica (MO).....	31
3.2.6.	Distribuição de Tamanho de Partícula (DTP) - Malvern.....	31
3.2.7.	Distribuição de Tamanhos de Partícula (DTP) - ZetaSizer-Nano.....	31
3.2.8.	Ângulo de Contato.....	32
3.2.9.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	33
3.2.10.	Área Específica, Diâmetro Médio de Poro e Volume Específico de Poros - Isoterma de BET.....	33
3.2.11.	Análise Gravimétrica para Determinação da Conversão e do Teor de Sólidos.....	34
3.3.	Etapas de Imobilização Enzimática por Adsorção Física.....	35
3.3.1.	Materiais.....	35
3.3.1.1.	Unidade experimental.....	35
3.3.1.2.	Reagentes.....	36

3.3.2.	Metodologia Experimental (Imobilização) .....	37
3.3.2.1.	Avaliação da Cinética de Imobilização Baseada na Atividade de Hidrólise da Enzima Solúvel .....	39
3.3.2.2.	Atividade de Hidrólise do Biocatalisador .....	41
3.3.2.3.	Atividade de Esterificação do Biocatalisador .....	42
3.3.2.4.	Cinética de Imobilização Baseada na Dosagem de Proteína .....	43
4.	Resultados e Discussões .....	45
4.1.	Polímeros com Morfologia Casca-Núcleo .....	45
4.2.	Imobilização Enzimática .....	63
5.	Conclusão .....	77
5.1.	Sugestões para Trabalhos Futuros .....	78
Anexo A	.....	79
Anexo B	.....	82
Anexo C	.....	86
Anexo D	.....	88
Anexo E	.....	89
6.	Bibliografia .....	90

## Lista de Figuras

Figura 1: Esquema genérico do mecanismo de reação de uma polimerização em cadeia envolvendo monômero vinílico (ODIAN, 2004).....	3
Figura 2: Descrição clássica das diferentes etapas do processo de polimerização em emulsão (adaptado de KIPARISSIDES, 1996). .....	9
Figura 3: Partícula com morfologia casca-núcleo gerada da polimerização simultânea em suspensão e emulsão (LENZI <i>et al.</i> , 2003). .....	11
Figura 4: Mecanismo para formação das partículas casca-núcleo, com casca porosa. $T_R$ é a temperatura do meio reacional; $T_{mfr}$ é a temperatura mínima de formação de filme na casca e está diretamente relacionada a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do material que a compõe (BESTETI, 2009).....	12
Figura 5: Métodos usuais de imobilização de enzimas (BRÍGIDA, 2010). .....	14
Figura 6: Esquema da unidade de polimerização utilizada para síntese das partículas de polímero com morfologia casca-núcleo. Figura adaptada de (LENZI, 2002). .....	20
Figura 7: Esquema simplificado da cromatografia de permeação em gel (GPC) (CANEVAROLO, 2002). .....	27
Figura 8: Esquema da unidade experimental utilizada para a imobilização dos suportes (PINTO, 2013). .....	36
Figura 9: Reação de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil laurato.....	39
Figura 10: Reação de esterificação do ácido oleico. ....	43
Figura 11: Núcleos de PS produzidos na polimerização em suspensão com duração de 2 horas de reação. A régua possui dimensão de 1000 $\mu\text{m}$ (PINTO, 2013). .....	46
Figura 12: Micrografias eletrônicas por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de PS/PS. A) partícula recoberta; B) casca vazia gerada na emulsão alimentada. Micrografia mostra que o núcleo das partículas casca-núcleo é composto na realidade pela aglomeração de vários núcleos gerados no processo de polimerização em suspensão. ....	47
Figura 13: Micrografias eletrônica por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de Poli(cardanol-co-estireno)/Poliestireno. A) partícula parcialmente recoberta; B) Baixa quantidade de partículas recobertas. ....	48
Figura 14: Micrografias eletrônicas por varredura (MEV) e ótica (MO) de partículas casca-núcleo de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/poliestireno. A) partícula parcialmente recoberta; B) Superfície da casca de poli(benzoato de vinila-co-estireno) formada; C) micrografia ótica de partículas casca-núcleo de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/poliestireno, tamanho da régua de 1000 $\mu\text{m}$ .....	48
Figura 15: Micrografias eletrônica por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de Poli(octeno-co-estireno)/Poliestireno. A) partícula totalmente recoberta; B) Partículas com recobrimento uniforme; C) superfície das partículas constituídas de nano esferas geradas na etapa de emulsão. ....	49

Figura 16: Micrografias eletrônicas por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de Poli(divinilbenzeno-co-estireno)/Poliestireno. A) Partícula totalmente recoberta; B) Superfície da casca da partícula; C) Micrografia ótica das partículas casca-núcleo; D) Partícula contendo múltiplos núcleos, gerados na etapa de polimerização em suspensão, agregados e que estão recobertos pelas partículas da polimerização em emulsão. ....	50
Figura 17: Curvas de conversão das polimerizações simultâneas em suspensão e emulsão de: PS/PS; poli(cardanol-co-estireno)/PS; poli(octeno-co-estireno)/PS; poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS; poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS. ....	51
Figura 18: Distribuições de massas molares das partículas casca-núcleo. ....	53
Figura 19: Relação entre temperatura de transição vítrea (Tg) e massa molar ponderal média (Mw) das partículas casca-núcleo. ....	55
Figura 20: Distribuições de tamanhos das partículas casca-núcleo: (A) PS/PS; (B) poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS; (C) poli(octeno-co-estireno)/PS; (D) poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS e (E) poli(cardanol-co-estireno)/PS. ....	57
Figura 21: Relação entre diâmetro médio de poro e área superficial das partículas casca-núcleo. ....	59
Figura 22: Relação entre diâmetro das partículas geradas pela polimerização em emulsão e diâmetro médio de poros das partículas casca-núcleo. ....	59
Figura 23: Relação entre área específica e volume de poros das partículas casca-núcleo. ....	60
Figura 24: Estrutura dos copolímeros presentes nas cascas das partículas com núcleo de poliestireno (PS). ....	62
Figura 25: Perfil cinético da imobilização da CAL-B nos suportes casca-núcleo. Cinética acompanhada pela medida da atividade de hidrólise da enzima presente em sua forma solúvel no sobrenadante ao longo do processo de imobilização. ....	63
Figura 26: Gráfico, Log Log da cinética do processo de imobilização baseada na atividade de hidrólise da enzima solúvel presente no sobrenadante ao longo da imobilização. ....	64
Figura 27: Eficiência de imobilização dos suportes casca-núcleo com diferentes composições de casca. ....	65
Figura 28: Perfil cinético de imobilização baseado na quantidade de proteína presente no meio, ao longo da imobilização. ....	65
Figura 29: Relação entre eficiência de imobilização e grau de hidrofobicidade. ....	67
Figura 30: Relação entre eficiência de imobilização e área específica. ....	67
Figura 31: Relação entre eficiência de imobilização e diâmetro médio de poro. ....	67
Figura 32: Interação entre eficiência de imobilização, área específica e ângulo de contato. ....	68
Figura 33: Atividade de hidrólise dos biocatalisadores (enzima imobilizada). ....	69
Figura 34: Relação entre atividade de hidrólise da enzima imobilizada e a hidrofobicidade dos suportes casca-núcleo. ....	70

Figura 35: Relação entre atividade de hidrólise da enzima imobilizada e a área superficial específica dos suportes casca-núcleo.....	70
Figura 36: Relação entre área específica, ângulo de contato na atividade de hidrólise da enzima imobilizada.....	71
Figura 37: Retenção de atividade de hidrólise dos biocatalisadores (enzimas imobilizadas nos suportes). .....	72
Figura 38: Relação entre retenção de atividade grau de hidrofobicidade.....	73
Figura 39: Relação entre retenção de atividade e área específica. ....	73
Figura 40: Influência da retenção de atividade de hidrólise com a área específica e a hidrofobicidade (polaridade) dos biocatalizador. ....	73
Figura 41: Atividade de esterificação dos biocatalisadores (enzima imobilizada). ....	74
Figura 42: Relação entre atividade de esterificação e área superficial específica dos suportes casca-núcleo. ....	75
Figura 43: Relação entre atividade de esterificação e hidrofobicidade dos suportes casca-núcleo.....	75
Figura 44: Relação entre atividade de esterificação por área específica e grau de hidrofobicidade dos suportes casca-núcleo.....	76
Figura 45: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-octeno) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero 1-octeno de: 1%, 5% em massa. ....	82
Figura 46: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de 1-octeno.....	82
Figura 47: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-benzoato de vinila) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero benzoato de vinila de: 1% e 5% em massa.....	83
Figura 48: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de benzoato de vinila. ....	83
Figura 49: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-cardanol) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero cardanol de: 1% e 5% em massa. ....	84
Figura 50: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de cardanol.....	84
Figura 51: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-divinilbenzeno) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero divinilbenzeno (DVB) de: 1% e 5% em massa.....	85
Figura 52: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de divinilbenzeno.....	85

Figura 53: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de PS/PS. Análise realizada em duplicata. ....	86
Figura 54: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(octeno-co-estireno)/PS. Análise realizada em duplicata. ....	86
Figura 55: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS. Análise realizada em duplicata. ....	87
Figura 56: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(cardanol-co-estireno)/PS (fase do topo). Análise realizada em duplicata. ....	87
Figura 57: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS. Análise realizada em duplicata. ....	87
Figura 58: Espectros de FTIR das partículas poliméricas usadas nas imobilizações da CAL-B. ....	88
Figura 59: Curva padrão no UV-vís de BSA, utilizada para dosagem de proteína presente nos sobrenadantes colhidos durante as imobilizações. ....	89

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Condições reacionais empregadas na etapa de polimerização em suspensão para obtenção dos núcleos de estireno das polimerizações simultâneas em suspensão e emulsão. ....	23
Tabela 2: Condições operacionais empregadas na etapa de polimerização em emulsão, com vazão de alimentação controlada, para formação da casca ao redor do núcleo produzido na suspensão. ....	24
Tabela 3: Condições reacionais empregadas para estudo cinético das reações de polimerização em massa entre o estireno e os comonômeros: DVB, 1-octeno, benzoato de vinila e cardanol. Mistura reacional (de monômero e iniciador) preparada para 12 tubos de ensaio. ....	25
Tabela 4: Condições utilizadas para o preparo da solução de substrato empregada na etapa de imobilização dos suportes. ....	38
Tabela 5: Valores de diâmetro médio de partícula e teor de sólidos de amostras dos sobrenadantes das reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão. ....	52
Tabela 6: Valores de massa molar ponderal média ( $M_w$ ), índice de polidispersão (IP) e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) das partículas casca-núcleo sintetizadas. Parâmetros obtidos através da análise de GPC ( $M_w$ e IP) e DSC ( $T_g$ ). ....	54
Tabela 7: Valores de diâmetro médio de partículas casca-núcleo obtidos através da análise de distribuição de tamanhos de partículas. ....	56
Tabela 8: Resultados de área específica, diâmetro médio de poro e volume de poro, das partículas casca-núcleo. ....	58
Tabela 9: Valores de ângulo de contato das partículas com diferentes composições na casca em relação a água. ....	60

## Lista de Equações

Equação 1: Equação utilizada para cálculo do ângulo de contato.....	32
Equação 2: Utilizada para cálculo do teor de sólidos.....	35
Equação 3: Atividade de hidrólise da enzima solúvel (PINTO, 2013). ....	40
Equação 4: Cálculo para o eficiência de imobilização (PINTO, 2013). ....	40
Equação 5: Equação utilizada para cálculo da atividade de hidrólise dos biocatalisadores (PINTO, 2013). .....	41
Equação 6: Equação para cálculo da retenção de atividade do biocatalisador (PINTO, 2013). ....	42
Equação 7: Equação utilizada para o cálculo da atividade de esterificação dos biocatalisadores (PINTO, 2013). ....	43
Equação 8: Equação utilizada para cálculo da concentração de proteína presente nos sobrenadantes ao longo da imobilização (PINTO, 2013). ....	44
Equação 9: Equação utilizada para calcular a quantidade de proteína retida no suporte ao final de cada imobilização (PINTO, 2013). ....	44
Equação 10: Massa de monômero alimentada na etapa de emulsão alimentada entre cada tempo de amostragem. ....	79
Equação 11: Massa total de monômero alimentada até o instante N+1 na etapa de polimerização em emulsão alimentada. ....	79
Equação 12: Porcentagem mássica de cada componente presente no meio reacional. ....	80
Equação 13: Massa total de reagentes presentes no meio reacional no tempo N+1. ....	80
Equação 14: Cálculo de conversão para cada intervalo de tempo analisado. ....	81

# 1. Introdução

A utilização de enzimas em processos industriais tem gerado crescente interesse comercial e aumentado a cada ano, devido ao fato das enzimas serem catalisadores naturais que possuem alta especificidade, seletividade e eficiência em condições reacionais suaves (brandas). Além de apresentarem eficiência maior que a dos catalisadores sintéticos convencionais, as enzimas vêm sendo amplamente utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica, química, têxtil e de biodiesel, dentre outras (CASTRO *et al.*, 2008; DELLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

No entanto, há algumas desvantagens relacionadas à utilização de enzimas na forma solúvel, em processos biotecnológicos, como o fato das enzimas estarem sujeitas à inativação por fatores físicos, químicos ou biológicos, que podem ocorrer durante a estocagem ou uso. Para que a catálise promovida pelas enzimas seja eficiente em um determinado processo, é necessário protegê-las do meio reacional em que se encontram, pois alguns constituintes do meio (como solventes e impurezas) podem provocar a inativação, ou seja, a perda de atividade, influenciando negativamente a reação. Além disso, enzimas são catalisadores caros, de difícil produção em estado puro, sendo economicamente conveniente recuperá-las ao final do processo. Devido a esses fatos, técnicas de imobilização vêm sendo desenvolvidas e aplicadas para melhorar a estabilidade e facilitar a recuperação das enzimas, possibilitando a sua reutilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000). A utilização dessas técnicas vem crescendo com o passar dos anos, resultando em novas aplicações industriais e desenvolvimento biotecnológico na área de biocatálise. O uso de enzimas imobilizadas (biocatalisadores imobilizados) vem crescendo principalmente na indústria farmacêutica, de detergentes e de couro.

Nas reações conduzidas em meio orgânico com enzimas imobilizadas, não há usualmente a necessidade de forte interação entre a enzima imobilizada e o suporte, já que boa parte das enzimas é insolúvel em meio apolar (SALIS *et al.*, 2003). Métodos de imobilização que não envolvem a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte são, por isso, muito utilizados, pois após a perda de atividade do biocatalisador imobilizado, é possível remover a enzima do suporte e este pode ser reciclado. Por essa razão, a imobilização de enzimas por adsorção física constitui um método bastante apropriado para produzir biocatalisadores, por ser um método de fácil realização, de baixo custo e apresentar menor risco de destruir a estrutura tridimensional da enzima, mantendo assim a sua atividade (SALIS *et al.*, 2003).

Para ser empregado como suporte, o material precisa apresentar características básicas, como ser insolúvel no meio, interagir com a enzima (para evitar a dessorção, mas não a ponto de inativar a enzima), ter porosidade adequada, baixo custo de produção e ser estável mecanicamente.

Por conta do que foi discutido, o método de imobilização usado no presente projeto, explora a adsorção física das enzimas nos suportes com diferentes funcionalizações. A enzima de interesse utilizada no presente trabalho foi a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B), catalisa diversas reações importantes, como a síntese de biodiesel, resolução de fármacos (separação de racematos), etc. Como suportes para as imobilizações, são utilizados polímeros sintéticos de baixo custo, fácil produção e com características manipuláveis (como porosidade, composição e morfologia) para melhorar a interação entre o suporte e a enzima (BESTETI, 2011; PINTO, 2013). Os suportes usados têm estrutura do tipo casca-núcleo, formados por um núcleo de poliestireno (PS) e com cascas de diferentes composições produzidas com monômeros vinílicos hidrofóbicos, como cardanol, 1-octeno, benzoato de vinila, divinilbenzeno e estireno.

Os suportes poliméricos foram sintetizados com auxílio da técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003). Na primeira etapa do processo é conduzida uma polimerização em suspensão clássica, em que um núcleo não poroso e viscoso é formado. Na segunda etapa, é realizada uma polimerização em emulsão alimentada, que gera partículas em escala nanométrica que são capturadas pelo núcleo viscoso, dando origem à casca (BESTETI, 2011). Essas partículas que se aglomeram ao redor do núcleo levam à formação de poros na casca, tornando as partículas casca-núcleo adequadas para uso como suportes poliméricos na imobilização de enzima (PINTO *et al.*, 2004).

É importante salientar que, no presente trabalho, o termo biocatalisador corresponde a enzima imobilizada nos suportes.

Os suportes poliméricos com morfologia casca-núcleo foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Engenharia de Polímeros do Programa de Engenharia Química da COPPE (EngePol/PEQ/COPPE/UFRJ). Já a etapa de imobilização com a enzima CAL-B e posterior caracterização do desempenho dos biocatalisadores (enzima imobilizada), foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química (LaBiM/IQ/UFRJ).

## **1.1. Mecanismos e Sistemas de Polimerização**

De acordo com ODIAN (2004), as reações que geram polímeros sintéticos podem ser usualmente classificadas quanto ao mecanismo de crescimento de cadeia em polimerizações em etapas e em cadeia (PINTO, 2013). O mecanismo de polimerização em etapas consiste na reação entre grupos funcionais dos monômeros (multifuncionais) envolvidos na reação (ODIAN, 2004). Reações que são regidas por esse mecanismo resultam em crescimento lento da cadeia polimérica. Já o mecanismo de polimerização em cadeia está normalmente relacionado à utilização de uma espécie iniciadora, que possui um centro reativo para a polimerização. Essa espécie iniciadora pode ser um radical livre, um

cátion, um ânion ou um complexo metálico (ODIAN, 2004). A espécie reativa reage com o monômero por meio do rompimento da ligação  $\pi$ , formando uma nova espécie reativa. A propagação do centro reativo se dá por adições sequenciais de um grande número de moléculas de monômeros, a partir do centro reativo, numa reação em cadeia (ODIAN, 2004). A polimerização em cadeia é constituída por três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, ocorre a formação da espécie reativa e a adição dessa espécie a uma molécula de monômero. Na propagação, ocorre o crescimento da cadeia polimérica pela adição sucessiva de moléculas de monômero ao centro reativo da cadeia em crescimento. Na última etapa, terminação, ocorre a interrupção do crescimento das cadeias poliméricas pela destruição do centro reativo (ODIAN, 2004). O esquema genérico do mecanismo de reação de uma polimerização em cadeia está apresentado na Figura 1.

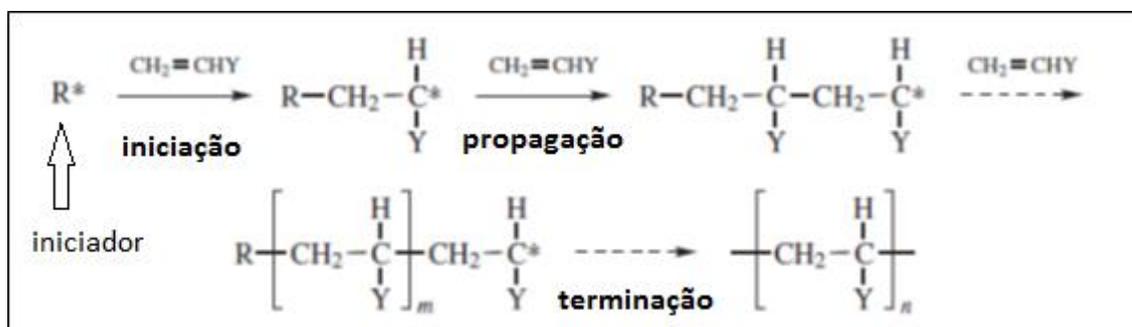


Figura 1: Esquema genérico do mecanismo de reação de uma polimerização em cadeia envolvendo monômero vinílico (ODIAN, 2004).

Os processos de polimerização são normalmente classificados em dois grupos distintos: os processos homogêneos e os heterogêneos. As técnicas de polimerização em massa e polimerização em solução fazem parte do grupo de processos homogêneos, em que as reações ocorrem em uma única fase (KIPARISSIDES, 1996). Já as reações de polimerização em lama, emulsão, suspensão, interfacial, em fase sólida e em fase gasosa fazem parte do grupo de processos heterogêneos. Nos processos heterogêneos, o polímero é insolúvel numa fase contínua e a reação de polimerização ocorre na presença de ao menos duas fases (KIPARISSIDES, 1996; MANO e MENDES, 1999).

Os processos heterogêneos de polimerização, são muito utilizados para produzir partículas poliméricas (PINTO, 2013). Cada tipo de processo origina partículas poliméricas com diferentes propriedades, para uso posterior em diferentes aplicações (KIPARISSIDES, 1996; PINTO, 2013). Segundo LENZI (2002, 2003), é possível realizar a combinação de dois processos heterogêneos distintos para obter partículas poliméricas com características ainda mais peculiares. As reações realizadas no presente trabalho, para obtenção dos suportes poliméricos com morfologia casca-núcleo, são originadas da combinação de dois processos clássicos de polimerização: a polimerização em suspensão e em emulsão via radicais livres, ocorrendo de forma simultânea.

## **1.2. Polimerização em Suspensão via Radicais Livres**

Na polimerização em suspensão via radicais livres emprega-se, além do monômero insolúvel em água (a fase contínua), um iniciador solúvel no monômero (constituindo a fase orgânica ou monomérica) e um agente de suspensão (tensoativos usados para estabilizar a suspensão) como por exemplo poli(álcool vinílico), poli(estireno sulfonado) de sódio, hidroxipropil celulose. A iniciação das reações é realizada por agentes químicos do tipo percompostos (ex: peróxido de benzoíla) ou azocompostos (ex: azobis(isobutironitrila)) (MANO e MENDES, 1999) através da decomposição térmica, fotoquímica ou por reações de oxi-redução dos iniciadores, gerando assim os radicais livres.

A polimerização em suspensão clássica, também conhecida como polimerização em suspensão do tipo pérola, ocorre com a dispersão da fase orgânica na fase aquosa contínua. A fase orgânica, que contém monômero e iniciador, fica dispersa em forma de gotículas na fase aquosa, devido ao uso combinado de agitação mecânica e adição de agentes de suspensão. Com o passar do tempo, a reação de polimerização ocorre no interior das gotículas de monômero, que vão se tornando cada vez mais pegajosas e viscosas até constituírem partículas sólidas (BESTETI, 2009), (PINTO, 2013). Para prevenir a coalescência dessas gotículas de monômero, é necessário aplicar agitação ao meio e adicionar agentes estabilizantes de suspensão (ODIAN, 2004). As reações seguem essencialmente o mesmo mecanismo de reação da polimerização em massa, de maneira que cada gotícula de monômero se assemelha a um micro-reator, no qual ocorrem as polimerizações em massa (BRAUN, 2005). Por meio desse processo de polimerização é possível obter partículas esféricas com uma faixa típica de distribuição de tamanhos de 10 – 1000  $\mu\text{m}$  (KIPARISSIDES, 1996). Esse processo é usado para produzir alguns dos polímeros mais utilizados comercialmente, como o poliestireno (PS), poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poli(cloreto de vinila) (PVC) (MANO e MENDES, 1999).

A polimerização em suspensão do tipo pérola foi utilizada no presente trabalho para preparar os núcleos de poliestireno (PS), nas reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão, usadas para síntese das partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo, utilizadas como suportes poliméricos para imobilização de enzimas.

### **1.2.1. Fatores que Influenciam a Distribuição dos Tamanhos de Partículas (DTP)**

A polimerização em suspensão do tipo pérola resulta em partículas poliméricas esféricas solúveis no monômero. As distribuições de tamanhos de partículas (DTP) geradas ao final da reação dependem da distribuição inicial de tamanhos das gotas de monômero dispersas na fase aquosa e de fatores operacionais que influenciam a sua evolução, como a velocidade de agitação, a quantidade de

agente de suspensão adicionada ao meio, o tamanho e a forma geométrica do reator e do impelidor e o iniciador utilizado.

#### *1.2.1.1. Agentes Estabilizantes da Suspensão (Agentes de Suspensão)*

Como ao longo da reação, as gotículas de monômero ficam viscosas e para evitar a coalescência utiliza-se um agente suspensão solúvel na fase contínua (MACHADO *et al.*, 2007). O agente de suspensão estabiliza as gotas suspensas por meio da diminuição da tensão interfacial entre as gotas de monômero e a água (MACHADO *et al.*, 2007). Além disso, as moléculas do agente de suspensão adsorvidas sobre a superfície das gotas de monômero formam uma camada fina que evita a coalescência das gotas quando ocorre a colisão entre elas (MACHADO *et al.*, 2007). O agente estabilizante da suspensão usado nas reações de polimerização simultânea foi o poli(álcool vinílico) (PVA).

#### *1.2.1.2. Velocidade de Agitação*

A velocidade de agitação é importante porque, além de facilitar a mistura dos componentes e ajudar a prevenir a coalescência, também atua no controle de temperatura da reação. Porém, a velocidade de agitação muito elevada pode causar um aumento expressivo das taxas de quebras das gotas de monômero, resultando na produção de partículas poliméricas muito pequenas e também pode diminuir a espessura da camada protetora de estabilizante na superfície da gota de monômero, por causa da dessorção de moléculas provocada pela agitação muito alta e pelo aumento da área superficial, promovendo a coalescência das partículas (MACHADO *et al.*, 2007). A diminuição da velocidade de agitação resulta na produção de partículas grandes, pois as taxas de quebra das gotas de monômero são menores. Assim, a DTP do polímero final está relacionada a um equilíbrio entre as taxas de quebra e coalescência das gotas de monômeros, as quais estão diretamente relacionadas com a velocidade de agitação e a natureza e concentração do agente estabilizante (MACHADO *et al.*, 2007).

#### *1.2.1.3. Forma e Tamanho do Reator e do Impelidor*

Dependendo da forma e tamanho do reator e do impelidor, formam-se perfis espaciais diferentes de cisalhamento no interior de um reator. Como resultado, modificam-se os fenômenos de quebra e cisalhamento, levando à geração de diferentes distribuições de tamanhos de partículas (PINTO, 2013).

### **1.2.2. Iniciador**

O iniciador utilizado na etapa de suspensão foi um percomposto, o peróxido de benzóila (BPO), solúvel na fase orgânica. O BPO é provavelmente o iniciador mais usado em todo o mundo para promover reações de polimerização por via radicalar. Nas reações foi utilizada a iniciação térmica para gerar as espécies reativas (radicais livres) que dão início às reações de polimerização. Geralmente, a quantidade de iniciador utilizada nas reações de polimerização em suspensão varia de 0,1- 0,5% em massa, em relação ao monômero usado (MACHADO *et al.*, 2007). Ao longo das reações, a eficiência do iniciador pode diminuir por causa do “efeito gaiola” (MACHADO *et al.*, 2007). Esse efeito resulta do confinamento dos radicais por moléculas do solvente ou do polímero, impedindo a reação com o monômero, ou seja, há uma resistência à difusão no meio reacional, dificultando a participação do iniciador nas reações.

### **1.2.3. Efeito Gel**

O efeito gel é um fenômeno cinético que está relacionado ao aumento da viscosidade do meio reacional. Durante a reação quando a viscosidade do meio reacional aumenta, ocorre uma redução da mobilidade das cadeias poliméricas em crescimento, de modo que a velocidade de terminação da reação cai drasticamente, resultando assim em uma auto – aceleração da reação de polimerização e em alguns casos pode também ocorrer o aumento brusco da temperatura (MACHADO *et al.*, 2007). Esse efeito leva à produção de polímeros com uma curva de distribuição de massas molares larga.

## **1.3. Polimerização em Emulsão**

Na polimerização em emulsão clássica utiliza-se um monômero insolúvel em água e um iniciador que seja solúvel na fase aquosa (normalmente água), de maneira que a etapa de iniciação ocorre na fase aquosa. Além disso, adicionam-se surfactantes de grande poder de dispersão e que, devido a sua concentração no meio, formam micelas na fase aquosa. Assim, a polimerização em emulsão ocorre no interior das micelas, que incham com monômero e aumentam de volume transformando-se em partículas de látex (com dimensões nanométricas). A taxa de polimerização depende do número de micelas presentes no meio e da concentração do emulsificante (BRAUN, 2005). Por isso, a taxa e o grau de polimerização podem ser aumentados simultaneamente, algo que não ocorre na polimerização em suspensão.

A polimerização em emulsão ocorre em meio heterogêneo, em que uma dispersão de monômeros é convertida via radicais livres em uma dispersão estável de partículas poliméricas com tamanhos característicos variando de 100- 1000 nm (KIPARISSIDES, 1996). Nessas polimerizações são utilizados um monômero (ou mistura de monômeros), um meio dispersante (normalmente água, (fase aquosa)), um iniciador solúvel na fase aquosa (como o persulfato de potássio), agentes tamponantes de pH e um agente emulsificante (surfactante), responsável pela formação das micelas.

A polimerização se inicia quando o iniciador é colocado na fase aquosa. O meio reacional contém micelas de emulsificante inchadas com monômero, além de moléculas dissolvidas do emulsificante, radicais livres gerados pelo iniciador e gotas de monômero. O diâmetro das gotas de monômero é muito maior que o das micelas e a concentração de monômero dentro das gotas é maior que a concentração de monômero nas micelas (BRAUN, 2005). Como a área de contato das micelas é maior que a das gotas de monômero, as micelas capturam preferencialmente os radicais gerados na água e a reação ocorre no seu interior. Com o decorrer da reação, as micelas vão absorvendo monômero, e vai sendo formado o látex (polímero inchado com monômero) (BRAUN, 2005; KIPARISSIDES, 1996). Como o monômero consumido nas micelas durante a polimerização é repostado pelo monômero presente nas gotas de monômero, as gotas funcionam como reservatórios de monômeros (BRAUN, 2005), dando continuidade à polimerização em emulsão até que todo o monômero seja convertido em polímero. Como produto final da reação de polimerização, são obtidas partículas poliméricas com uma distribuição de tamanhos variando na faixa de 100 – 1000 nm (BRAUN, 2005). Esse processo de polimerização é usado comercialmente para produzir muitas resinas, como a borracha do tipo SBR (copolímero de estireno e butadieno), neoprene, dentre outros (KIPARISSIDES, 1996). As principais vantagens apresentadas por esse processo são o fácil controle térmico, pois o meio reacional apresenta baixa viscosidade, e o fato da conversão chegar a valores próximos de 100% e com altas taxas de polimerização.

### **1.3.1. Iniciador**

Ao contrário da polimerização em suspensão, na reação de polimerização em emulsão utilizam-se iniciadores solúveis na fase aquosa contínua. Os iniciadores mais utilizados são percompostos, como o persulfato de potássio, o persulfato de amônio e o peróxido de hidrogênio (ODIAN, 2004).

### **1.3.2. Emulsificante**

Os agentes emulsificantes são moléculas anfifílicas que possuem uma parte da cadeia com características hidrofílicas e outra parte com características hidrofóbicas. Em uma polimerização em emulsão os agentes emulsificantes desempenham um importantíssimo papel, pois estas moléculas são responsáveis pela formação das micelas, onde ocorrem as reações de polimerização. Micelas podem ser definidas como “clusters“ de emulsificantes, ou seja, agregados altamente organizados de moléculas de emulsificante (KIPARISSIDES, 1996).

Em soluções aquosas muito diluídas, os agentes emulsificantes encontram-se dissolvidos. Já em soluções com mais alta concentração, ocorrem algumas mudanças importantes nas propriedades da solução, como na viscosidade e na tensão superficial (BRAUN, 2005). A concentração a partir da qual é possível observar essas mudanças expressivas nas propriedades físicas da solução é chamada de concentração micelar crítica (CMC) (BRAUN, 2005) e está relacionada à formação das micelas.

A concentração micelar crítica (CMC) é característica para cada emulsificante. Para concentrações de emulsificante inferiores à CMC, o emulsificante encontra-se em solução como moléculas individuais. Para concentrações acima da CMC, o emulsificante forma micelas, em que a parte hidrofóbica da molécula fica organizada e em contato com o monômero, enquanto a parte hidrofílica fica espacialmente organizada e em contato com a fase aquosa (BRAUN, 2005). As micelas formadas durante a polimerização em emulsão possuem um tamanho característico de 1-10 nm (BRAUN, 2005).

### **1.3.3. Aditivos**

Muitos aditivos são comumente utilizados nas polimerizações em emulsão, como colóides protetores, agentes tamponantes de pH, reguladores de tensão superficial, dentre outros. Nas polimerizações simultâneas em suspensão e emulsão, foi utilizado como agente tamponante de pH o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ). A adição de uma solução tampão tem a função de estabilizar as partículas de látex em relação a variações no pH da reação (ODIAN, 2004).

### **1.3.4. Mecanismo da Polimerização em Emulsão**

Segundo Harkins, Smith e Ewart (SMITH e EWART, 1948) o mecanismo da reação de polimerização em emulsão pode ser dividido em três etapas, como mostra a Figura 2. A etapa inicial é conhecida como período de formação de partículas. Nessa etapa, ocorre a nucleação das micelas, que

formam as partículas do látex (partículas que contém ambos polímero e monômero). O monômero está presente no interior das micelas, inchando-as por razões meramente termodinâmicas. Com o passar do tempo, o monômero é continuamente repostado pelas gotas de monômero dispersas no meio e que funcionam como reservatórios de monômero que garantem a continuidade da polimerização.

Com o aumento de volume das partículas de látex, moléculas de emulsificante são adsorvidas da fase aquosa, levando à diminuição da concentração de moléculas de emulsificante livres ou agregado nas micelas. Eventualmente cessa o período de nucleação, com o desaparecimento das micelas.

A segunda etapa corresponde à polimerização no interior das partículas do látex com número de partículas constante. Nessa etapa, as gotas de monômero continuam tendo a função de prover o monômero necessário para manter a reação nas partículas do látex. Como consequências o número de partículas de látex e a concentração de monômero dentro dessas partículas (e, portanto, a taxa de polimerização) se mantêm constantes.

Na terceira etapa, as gotas de monômero presentes na fase aquosa desaparecem e todo o monômero residual está localizado no interior das partículas de látex. Nesse instante, a concentração de monômero no interior das partículas diminui devido à continuação da reação de polimerização.

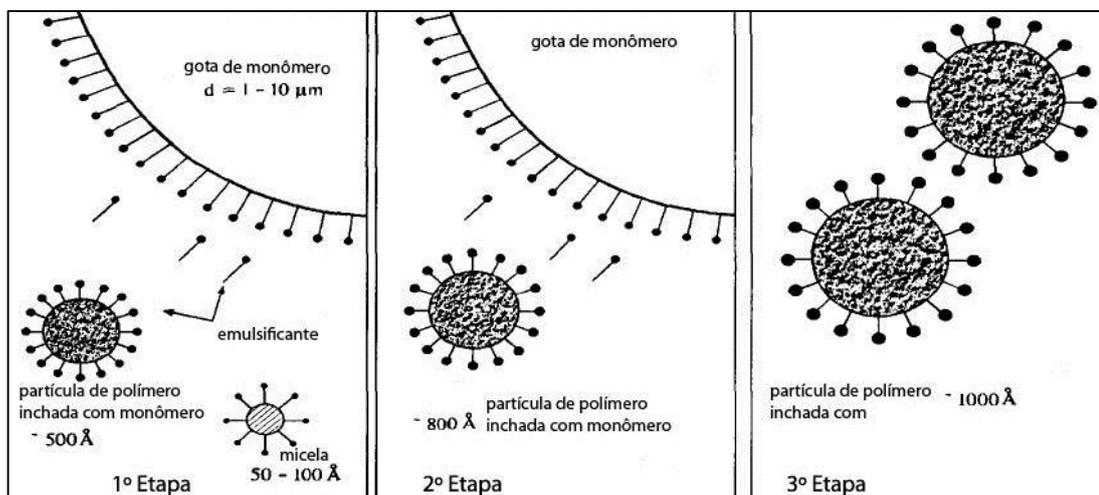


Figura 2: Descrição clássica das diferentes etapas do processo de polimerização em emulsão (adaptado de KIPARISSIDES, 1996).

### 1.3.5. Fatores que Influenciam a Distribuição dos Tamanhos das Partículas

A DTP das partículas formadas na emulsão dependem de vários fatores, como a fração do monômero dispersa no meio e as concentrações de emulsificante e de iniciador utilizados na reação. A concentração de sais (que controlam a viscosidade do meio) e a força iônica do meio são fatores também

importantes, pois afetam os processos de nucleação das partículas e influenciam os tamanhos finais (PINTO, 2013).

A concentração de emulsificante apresenta papel significativo sobre a evolução de DTP, pois é ela que controla os processos de nucleação das partículas. Assim, quanto maior for a concentração de emulsificante utilizada, menores serão os tamanhos das partículas geradas na polimerização em emulsão. Outras características relacionadas ao reator também podem influenciar a DTP das partículas de emulsão, como o tipo de impelidor utilizado e o formato do reator (RAMIREZ *et al.*, 2005) contudo, esses fatores são em geral pouco importantes nessas reações.

#### **1.4. Síntese de Partículas Casca-Núcleo a partir da Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão**

As partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo são formadas por estruturas poliméricas que apresentam características diferentes em uma mesma partícula. Partículas casca-núcleo são constituídas por um núcleo e uma casca que o circunda, com diferentes propriedades físico-químicas e morfológicas (LENZI, 2002). Assim, é possível sintetizar partículas com núcleo e casca que apresentam porosidade e área específica distintas, por exemplo.

Diferentes processos podem ser utilizados para a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, visando diferentes aplicações. Por exemplo, na área biomédica essas partículas podem ser utilizadas como agentes embolizantes, na liberação controlada de fármacos, dentre outras aplicações (PEIXOTO, 2007; BESTETI, 2011). Partículas casca-núcleo são usualmente obtidas por intermédio da combinação de diferentes processo de polimerização.

A síntese de partículas casca-núcleo por meio da polimerização simultânea em suspensão e emulsão foi estudada e desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003). Essa técnica consiste na combinação de dois processos de polimerização: a polimerização em suspensão e a polimerização em emulsão. Na Figura 3 é possível observar uma partícula obtida por meio dessa técnica.

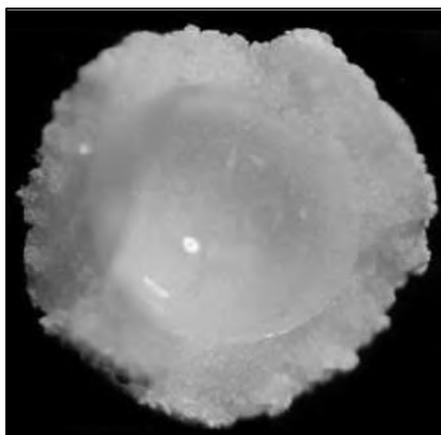


Figura 3: Partícula com morfologia casca-núcleo gerada da polimerização simultânea em suspensão e emulsão (LENZI *et al.*, 2003).

Primeiramente, é realizada uma polimerização em suspensão para preparação dos núcleos. Quando a reação atinge uma determinada conversão, são adicionados ao meio reacional os constituintes de uma polimerização em emulsão, sendo então considerado o início da polimerização em emulsão. Os dois processos de polimerização ocorrem simultaneamente dentro do vaso reacional, sem haver etapas de separação de constituintes do meio reacional. As partículas geradas durante a etapa de polimerização em emulsão são capturadas pelos núcleos gerados durante a polimerização em suspensão, aglomerando em torno dele e formando a casca, dando origem à partícula casca-núcleo. Dependendo do caráter pegajoso dos núcleos, estes são capazes de capturar muitas ou poucas partículas resultantes da emulsão. Segundo LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003), o caráter pegajoso do núcleo está relacionado à conversão. A conversão atingida no núcleo deve estar abaixo de um valor limite para que seja possível capturar as partículas originadas na etapa de emulsão, ou seja, o núcleo tem que possuir uma conversão baixa (ex: na polimerização em suspensão de PS, uma conversão de 75% corresponde a uma reação com 2 horas de duração).

Foi também observado que existe uma relação entre o tamanho do núcleo e o grau de recobrimento pelas partículas geradas na polimerização em emulsão. Quanto maior é o tamanho do núcleo formado, menor é a área de contato com o meio que contém as partículas geradas na emulsão, resultando em menor grau de recobrimento desses núcleos pelas partículas originárias da emulsão (LENZI, 2002).

BESTETI (2009) e BESTETI *et al.* (2011) realizaram estudos para obtenção de partículas casca-núcleo com diferentes composições de casca e núcleo, com o objetivo de aplicá-las como suportes em imobilizações enzimáticas (em especial para a imobilização da enzima CAL - B). Foi observado que as diferentes composições das partículas influenciam as características morfológicas e moleculares, como a porosidade e a área específica. Foi também observado que as partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo apresentavam uma casca porosa quando a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero

que constitui a casca, era maior que a temperatura do meio reacional. E quando a  $T_g$  do material da casca era menor que a temperatura do meio reacional, a casca formada em torno do núcleo tinha aspecto de filme (ou seja, não era poroso). Também foi notado que, para que houvesse um recobrimento considerável e uniforme do núcleo, era necessário que houvesse compatibilidade termodinâmica entre o material da casca e o do núcleo. Segundo BESTETI (2009) e BESTETI *et al.* (2011), o mecanismo que explica a formação de uma casca porosa está ilustrado na Figura 4.

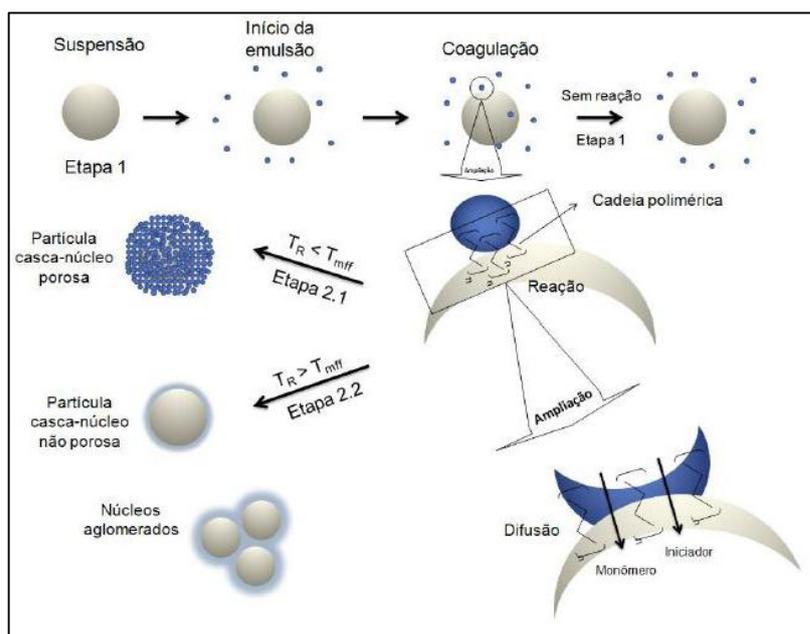


Figura 4: Mecanismo para formação das partículas casca-núcleo, com casca porosa.  $T_R$  é a temperatura do meio reacional;  $T_{mff}$  é a temperatura mínima de formação de filme na casca e está diretamente relacionada a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do material que a compõe (BESTETI, 2009).

## 1.5. Lipases

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores de maior representatividade comercial, devido à alta disponibilidade, baixo custo de produção, condições suaves de reação e por possuírem alta especificidade (FABER, 1997; STRAATHOF *et al.*, 2002). Dentre as hidrolases, destacam-se as lipases (glicerol éster hidrolases, E. C. 3.1.1.3), que são capazes de catalisar reações de hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa insolúveis, gerando ácidos graxos livre, mono e diacilgliceróis e glicerol. Quando a água no meio reacional é restringida, as lipases são capazes de exercer sua atividade catalítica reversa, ou seja, catalisar reações de esterificação e transesterificação (FREIRE, 1996). Lipases são capazes de catalisar essas reações com elevada seletividade, estabilidade e eficiência (FREIRE, 1996, 1988; FREIRE e CASTILHO, 2008). Devido a essas características, as lipases são aplicadas em diversas

áreas, como na indústria têxtil, de detergentes, farmacêutica (na resolução de misturas racêmicas), de química fina, de cosméticos, dentre outras (FREIRE e CASTILHO, 2008).

### **1.5.1. Fatores que Afetam a Atividade das Lipases**

A atividade catalítica das lipases pode ser determinada utilizando diferentes substratos. Dependendo do substrato utilizado, pode-se empregar diferentes técnicas para dosar a atividade da lipase, como métodos espectroscópicos, titulométricos, dentre outros. A atividade das lipases em um dado substrato depende de vários parâmetros, como pH do meio, temperatura, superfície de contato enzima-substrato e teor de água (BRÍGIDA, 2010).

### **1.5.2. Lipase B de *Candida antarctica***

A lipase B de *Candida antarctica* foi a enzima escolhida para uso nos ensaios de imobilização, por ser uma enzima com grande interesse industrial, principalmente na modificação de lipídeos para síntese de biodiesel e na indústria farmacêutica, para síntese de produtos e intermediários quirais (MANOEL, 2013). O pH ótimo para uso da CAL – B está situado entre 7 e 8, sendo que a enzima é bastante estereoespecífica em reações de hidrólise e em síntese orgânica (UPPENBERG *et al.*, 1994; CUNHA *et al.*, 2014).

## **1.6. Imobilização de Lipases**

Os processos que utilizam a enzima na forma solúvel apresentam algumas desvantagens, como a dificuldade de utilizá-la em operações contínuas e a sua difícil reutilização. Em reações que fazem uso de enzimas na forma solúvel, para obter o produto final é usualmente necessário interromper a reação com aumento de temperatura ou mudança do pH do meio, com objetivo de inativar a enzima. Ao realizar procedimentos como esses, põe-se em risco a qualidade do produto final obtido (FREIRE, 1988). Além disso, não é possível recuperar a enzima na forma pura e ativa, o que causa aumento expressivo dos custos. Assim, para que as enzimas possam ser utilizadas em processos industriais de grande porte, é necessário promover o aumento da estabilidade térmica e tornar possível o seu reuso (AL-ZUHAIR *et al.*, 2011; CHEN e CHEN, 2011).

Uma alternativa para solução dos problemas encontrados em processos homogêneos é a utilização de enzimas na forma imobilizada. Existe uma série de vantagens associadas à utilização de

enzimas imobilizadas, como a possibilidade da reutilização, o uso de operações contínuas, a melhora da estabilidade e da atividade da enzima, a capacidade de obtenção de produtos mais puros e a mais fácil separação do meio reacional (FREIRE e CASTILHO, 2008).

Entretanto, como desvantagens do processo de imobilização enzimática, podemos citar a perda de atividade da enzima devido à interação com o suporte, e a geração de possíveis impedimentos estéricos e difusionais de produtos e substratos, que podem ser induzidos pela estrutura do suporte. Outra desvantagem pode estar associada ao custo de obtenção dos biocatalisadores (enzimas imobilizadas) em função dos custos envolvidos na síntese dos suportes e no processo de imobilização. No entanto se esses custos forem baixos, a imobilização pode se tornar uma alternativa interessante para a utilização de enzimas em processos biotecnológicos.

A imobilização é um processo que consiste no confinamento da enzima, por ligação química ou interação física, em suportes (matrizes) insolúveis em meio aquoso. Ao final do processo, é essencial que haja boa retenção da atividade catalítica da enzima e que o suporte imobilizado possa ser reutilizado (BRÍGIDA, 2010).

As enzimas imobilizadas, podem ser classificadas quanto ao método de imobilização utilizado, segundo mostrado na Figura 5. O método de imobilização empregado depende de fatores como a estrutura química e morfológica do suporte, as propriedades bioquímicas das enzimas e o objetivo final para aplicação dos suportes imobilizados. É importante ressaltar, que pode haver uma combinação dos métodos. Na Figura 5 são apresentados os métodos existentes.



Figura 5: Métodos usuais de imobilização de enzimas (BRÍGIDA, 2010).

### **1.6.1. Imobilização por Adsorção**

A imobilização de enzimas por adsorção consiste na ligação da enzima a um suporte sólido insolúvel em meio aquoso por interação iônica, adsorção física, interação hidrofóbica, ou por forças atrativas de van der Waals. A interação da enzima com o suporte também pode ocorrer pela combinação dos vários tipos de interações mencionadas anteriormente, como na imobilização por adsorção física com interação hidrofóbica, método utilizado no presente trabalho para imobilização da CAL-B nos suportes casca-núcleo sintetizados.

A eficiência da adsorção da enzima sobre o suporte depende de vários parâmetros, como o tamanho da proteína (enzima) adsorvida, a área específica, a porosidade e o diâmetro médio de poros do suporte, o pH, a força iônica, a temperatura do meio, a concentração de enzima, o tempo de imobilização, dentre outros fatores (DELLA-VECCHIA *et al.*, 2004; VILLENEUVE *et al.*, 2000). O uso de suportes porosos é vantajoso, pois aumenta a área específica, já que a enzima pode ser adsorvida no interior dos poros (BESTETI, 2011).

Embora essa técnica esteja susceptível à dessorção, já que a ligação entre a enzima e o suporte é de baixa energia, a imobilização por adsorção é uma das técnicas mais utilizadas para obtenção de biocatalisadores insolúveis, por ser uma técnica simples e de baixo custo. Além disso, vários materiais podem ser utilizados como suportes na imobilização. A definição sobre qual material deve ser utilizado para a imobilização de uma determinada enzima depende de várias características, como a resistência mecânica, a estabilidade química, o caráter hidrofóbico/hidrofílico, a capacidade de adsorção da enzima e o custo (DELLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

### **1.6.2. Imobilização por Ligação Covalente em uma Matriz**

A imobilização da enzima à superfície de um suporte pode ocorrer por meio da formação de ligações covalentes entre grupamentos funcionais presentes na superfície do suporte e da enzima. Essa técnica apresenta normalmente duas etapas: a funcionalização do suporte e a imobilização por contato entre a enzima e o suporte, para que a reação ocorra (BRÍGIDA, 2010).

### **1.6.3. Imobilização por Encapsulamento (ou Oclusão)**

A enzima pode ser retida no interior de uma matriz polimérica, sem haver a formação de ligação química entre a matriz e a enzima, não ocorrendo alterações estruturais ou interações com o centro ativo da enzima. Nesse caso, moléculas grandes (como enzimas) podem não conseguir difundir através da

membrana, embora as moléculas pequenas (como produtos e substratos) possam (BRÍGIDA, 2010). Existem três tipos básicos de encapsulamento: em membrana (em filme), em matriz (numa rede porosa) e o microencapsulamento (em partículas).

#### **1.6.4. Imobilização por Ligação Cruzada Intermolecular**

A imobilização de enzimas pode ocorrer sem a utilização de um suporte. Isso pode ser feito por meio da realização de ligações cruzadas entre as próprias enzimas, formando agregados enzimáticos insolúveis em meio aquoso (BRÍGIDA, 2010; PINTO, 2013).

### **1.7. Fatores que Influenciam na Perda de Atividade da Enzima Após Imobilização**

Quando se imobiliza uma enzima em um suporte, podem ser observadas alterações na estabilidade, na atividade e nas propriedades cinéticas das enzimas, resultando na diminuição da atividade do biocatalisador obtido ao final do processo de imobilização (PINTO, 2013). Alguns fatores são responsáveis pela redução ou completa perda de atividade da enzima imobilizada, como comentado a seguir.

#### **1.7.1. Efeito Conformacional**

Após a imobilização da enzima no suporte, podem ocorrer modificações na estrutura tridimensional da enzima e no seu centro catalítico, como resultado da forte interação com o suporte, levando assim à perda de atividade.

#### **1.7.2. Efeitos Estéricos**

Como resultado de interações entre enzima e suporte, a enzima pode se tornar menos acessível a moléculas do substrato, gerando assim um impedimento estérico. Com isso, as moléculas do substrato não conseguem acessar o centro ativo das enzimas, sendo observada a queda na atividade ou a total inatividade da enzima.

### **1.7.3. Efeitos Difusionais**

Os efeitos difusionais, também conhecidos como efeitos de transferência de massa, são observados por causa da perda de mobilidade da enzima, por estar ligada a um suporte, e das moléculas reagentes, que têm que se movimentar para atingir os centros ativos. Com isso, a enzima perde a acessibilidade ao substrato devido à presença da matriz sólida, resultando em decréscimo da atividade enzimática. A diminuição de atividade também pode ocorrer devido ao acúmulo de produto nas proximidades do sítio ativo da enzima, afetando o mecanismo cinético da reação, a velocidade de reação, e o microambiente da enzima (CASTRO *et al.*, 2008).

Quando a enzima está imobilizada no suporte, o substrato precisa migrar do seio do fluido até a superfície do biocatalisador e daí até o sítio ativo da enzima. Em seguida, quando o substrato é transformado em produto, o produto precisa difundir do centro ativo da enzima até a superfície do suporte e depois para o seio do fluido (PINTO, 2013).

### **1.7.4. Efeitos Hidrofóbicos**

Polímeros hidrofóbicos têm sido amplamente estudados para uso como suportes para imobilização de lipases, pois muitas lipases apresentam um fenômeno de ativação interfacial na presença de superfícies hidrofóbicas. Essa ativação é relacionada à alteração conformacional da estrutura das lipases, devido à interação com a superfície hidrofóbica, que resulta na exposição do centro ativo da enzima, antes englobado pela estrutura hidrofóbica da enzima (SALIS *et al.*, 2003).

## **1.8. Comentários Finais**

Segundo estudos realizados por BESTETI (2009) e BESTETI (2011), observou-se que por meio da polimerização simultânea em suspensão e emulsão é possível obter partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo porosas e com diferentes composições de casca e núcleo. E que, variando a composição da casca é possível obter partículas com características morfológicas e moleculares distintas, como área específica e porosidade. Foi visto que devido a essas características apresentadas, as partículas podem ser utilizadas como suportes para imobilização enzimática e que essas características influenciam na atividade e na eficiência de imobilização das enzimas.

Viu-se também que a CAL-B é uma enzima de grande interesse, pois é aplicada em diversos processos biotecnológicos (FREIRE e CASTILHO., 2008). Com isso, é interessante utilizar a enzima na sua forma imobilizada para protegê-la de componentes presentes no meio reacional que podem, por

ventura, provocar a inativação e com isso, queda no rendimento de catálise. Estudos realizados com a CAL-B (SALIS *et al.*, 2003) mostraram que esta é uma enzima que apresenta um fenômeno de ativação interfacial quando em contato com superfícies hidrofóbicas. Devido a esse fator, o presente trabalho tem como objetivo imobilizar a enzima CAL-B em suportes poliméricos com diferentes composições, explorando os efeitos de interação hidrofóbica entre enzima e suporte e avaliar quais os fatores que afetam no processo de imobilização.

## 2. Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo, avaliar a influência que o grau de hidrofobicidade da superfície das partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo causa nos parâmetros de imobilização e na atividade da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) quando imobilizada. Para isso, foi necessário produzir partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo com diferentes composições e graus de hidrofobicidade na casca, e que foram utilizadas como suportes na imobilização. As partículas foram produzidas por meio da técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão e então foram caracterizadas.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão

##### 3.1.1. Materiais

##### Unidade de Polimerização

As reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão foram conduzidas em um unidade de polimerização a pressão atmosférica. Essa unidade reacional está ilustrada na Figura 6.

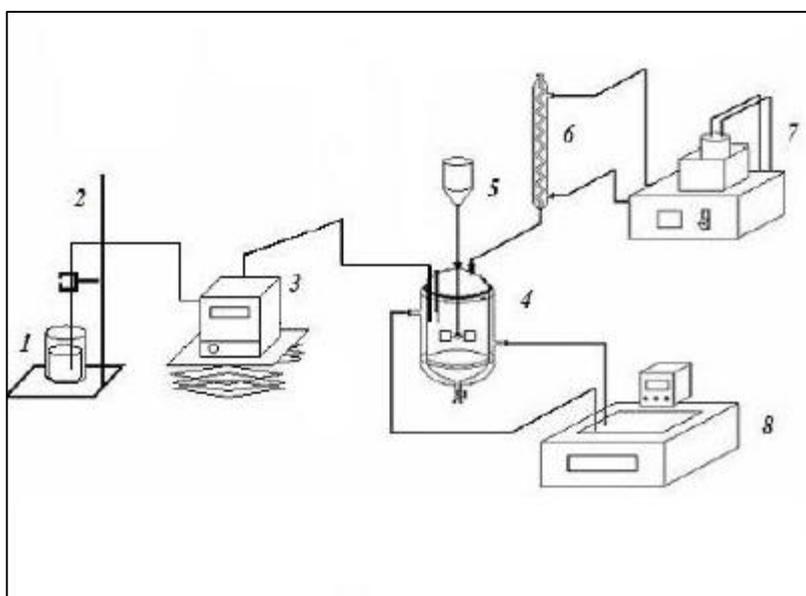


Figura 6: Esquema da unidade de polimerização utilizada para síntese das partículas de polímero com morfologia casca-núcleo. Figura adaptada de (LENZI, 2002).

Na Figura 6, a unidade de polimerização consiste de um reator encamisado de vidro borossilicato de capacidade de 1L (4), equipado com agitador mecânico (5) de haste reta e impelidor do tipo hélice plana, banho de aquecimento com temperatura controlada e que utiliza como fluido circulante uma mistura 1:1 em volume de etilenoglicol e água destilada (8), banho de resfriamento com temperatura controlada e que utiliza como fluido circulante uma mistura 1:1 em volume de etilenoglicol e água destilada (7), um condensador de refluxo do tipo espiral (6), uma bomba dosadora (3) e uma proveta (1), usada como reservatório da mistura de monômeros utilizada na alimentação na etapa de emulsão alimentada. A tampa do reator é feita de aço inox e contém cinco orifícios. A abertura central conecta-

se ao agitador mecânico. As demais aberturas são utilizadas para conectar o condensador, a mangueira de saída da bomba dosadora e para fazer a adição dos reagentes.

### 3.1.2. Reagentes

Os reagentes empregados na síntese das partículas poliméricas foram utilizados como recebido e não passaram por etapas de purificação ou tratamento prévio. Os reagentes são apresentados a seguir:

- 1) Poli(álcool vinílico) (PVA), fornecido pela Vetec Química Fina com 85% de grau de hidrólise e massa molar média (Mw) de 78.000 g/mol. Utilizado como agente de suspensão na etapa de polimerização em suspensão;
- 2) Peróxido de Benzoila (BPO), fornecido pela Vetec Química Fina, fornecido com pureza mínima de 99% e contendo teor máximo de umidade de 25%. Utilizado como iniciador na etapa da reação de polimerização em suspensão;
- 3) Estireno, fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 99%. Utilizado como monômero na etapa de polimerização em suspensão (formação do núcleo) e como co-monômero na etapa de polimerização em emulsão com vazão de alimentação controlada;
- 4) Lauril sulfato de sódio (SLS), fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 90%. Utilizado na etapa de polimerização em emulsão como emulsificante da reação;
- 5) Persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99%. Utilizado como iniciador da reação de polimerização em emulsão;
- 6) Bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), fornecido pela Petroquímicos, com pureza mínima de 99,7%. Utilizado como tampão na reação de polimerização em emulsão;
- 7) Hidroquinona, fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99%. Utilizado como inibidor nas análises gravimétricas para medida da conversão das reações de polimerização simultâneas em suspensão e emulsão;
- 8) Água destilada, utilizada na preparação das soluções aquosas de PVA (agente de suspensão), SLS (agente emulsificante),  $NaHCO_3$  (tampão) e  $K_2S_2O_8$  (iniciador da polimerização em emulsão);
- 9) Divinilbenzeno (DVB), fornecido pela Merck, com pureza mínima de 99%. Utilizado como comonômero na reação de polimerização em suspensão e emulsão;
- 10) 1-octeno, fornecido pela Merck com pureza mínima de 97%. Utilizado como comonômero na reação de polimerização em suspensão e emulsão;
- 11) Benzoato de vinila, fornecido pela Aldrich com pureza mínima de 99%. Utilizado como comonômero na reação de polimerização em suspensão e emulsão;

12) Cardanol, fornecido pela Resibrás, com pureza mínima de 95,40%. Utilizado como comonômero na reação de polimerização em suspensão e emulsão.

### **3.1.3. Metodologia Experimental**

#### **3.1.3.1. Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão**

O procedimento utilizado para a síntese das partículas casca-núcleo foi desenvolvido por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) e consiste em uma etapa de polimerização em suspensão, para a formação do núcleo das partículas, seguido de uma etapa de polimerização em emulsão alimentada, para a formação da casca porosa. As condições experimentais empregadas nas etapas de obtenção do núcleo e da casca das partículas foram as mesmas utilizadas por BESTETI (2009). Como monômero da etapa da polimerização em suspensão foi utilizado o estireno. Na etapa de polimerização em emulsão foram utilizados divinilbenzeno/estireno, cardanol/estireno, 1-octeno/estireno, benzoato de vinila/estireno e estireno. A composição do núcleo não foi variada, ou seja, todas as partículas casca-núcleo produzidas possuem núcleo de poliestireno.

##### *3.1.3.1.1. Etapa de Polimerização em Suspensão*

As reações de polimerização em suspensão têm como objetivo a preparação do núcleo de poliestireno (PS) das partículas casca-núcleo. Essas reações foram conduzidas em batelada. As condições reacionais, assim como as quantidades dos reagentes utilizados, estão apresentados na Tabela 1.

Primeiramente, preparou-se uma solução de agente de suspensão. Para isso, 3 g de PVA foram solubilizados em 370 g de água destilada por 24 h. Em seguida, adicionou-se ao reator, sob uma agitação de 100 rpm, a solução de PVA preparada previamente. Quando a temperatura do meio reacional atingiu 85 °C, foi realizada a adição da massa do iniciador (BPO) solubilizada na massa de monômero (estireno). A velocidade de agitação então foi aumentada para 970 rpm.

A adição ao reator da solução iniciador/monômero, marca o início da polimerização em suspensão. A etapa de polimerização em suspensão foi sempre conduzida por 2 horas.

Tabela 1: Condições reacionais empregadas na etapa de polimerização em suspensão para obtenção dos núcleos de estireno das polimerizações simultâneas em suspensão e emulsão.

<b>Condições da Polimerização em Suspensão</b>		
<b>Componente</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Função</b>
<b>PVA</b>	3	Agente de suspensão
<b>Água Destilada</b>	370	Fase contínua
<b>BPO</b>	4	Iniciador
<b>Estireno</b>	100	Monômero
<b>Velocidade de Agitação do Meio Reacional</b>		
	<b>970 ± 20 rpm</b>	
<b>Temperatura de Reação</b>		
	<b>85 °C</b>	
<b>Tempo de Reação</b>		
	<b>2 horas</b>	

### 3.1.3.1.2. *Etapa de Polimerização em Emulsão*

Ao término das duas horas de reação da etapa de polimerização em suspensão, os núcleos de PS estão formados, dando-se início à etapa de polimerização em emulsão para a produção da casca porosa. Faz-se então a adição dos reagentes necessários para a polimerização em emulsão. Ao final da polimerização em suspensão, os núcleos formados estão com alta viscosidade (ou seja, pegajosos), sendo então capazes de capturar as partículas produzidas na polimerização em emulsão, ocorrendo então o recobrimento do núcleo e levando à formação da casca (LENZI, 2002; BESTETI, 2009).

As reações em emulsão foram conduzidas no mesmo reator em que foram realizadas as reações em suspensão, sem que houvesse separação de quaisquer componentes do meio reacional ao término da etapa de polimerização em suspensão. Os reagentes e as respectivas quantidades dos mesmos são apresentados na Tabela 2.

As soluções de emulsificante, tampão e de iniciador foram preparadas 30 minutos antes do início da etapa de polimerização em emulsão. Para o preparo dessas soluções, utilizaram-se 50 g, 31 g e 31 g de água destilada, para solubilizar as massas de emulsificante, tampão e iniciador, respectivamente. A reação de polimerização em emulsão foi realizada em semi-batelada no mesmo reator em que foi realizada a etapa de suspensão e sem que os componentes do meio reacional da suspensão fossem separados.

Tabela 2: Condições operacionais empregadas na etapa de polimerização em emulsão, com vazão de alimentação controlada, para formação da casca ao redor do núcleo produzido na suspensão.

<b>Etapa de Polimerização em Emulsão</b>		
<b>Componente</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Função</b>
Lauril Sulfato de Sódio (SLS)	2,5	Agente emulsificante
Bicarbonato de Sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	0,3	Tampão
Persulfato de Potássio (K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	0,3	Iniciador
Água Destilada	115	Fase contínua
Estireno (carga inicial)	30 (30% em massa)	Monômero
<b>Emulsão Alimentada</b>		
<b>Componente</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Função</b>
Estireno	65 (65% em massa)	Monômero
Estireno, DVB, Benzoato de vinila, 1-octeno, cardanol	5 (5% em massa)	Comonômero
Vazão de alimentação	0,04 L/h (ou 35g/h)	
Tempo de emulsão alimentada	2 horas	
<b>Temperatura de Reação</b>	<b>85 °C</b>	
<b>Velocidade de Agitação do Meio Reacional</b>	<b>970 ± 20 rpm</b>	
<b>Tempo Total de Reação</b>	<b>4 horas</b>	

Terminada a etapa de suspensão, foram adicionados ao reator na seguinte ordem: solução de emulsificante, solução tampão de bicarbonato de sódio e 115 g de água destilada. O intervalo de tempo entre a adição dos componentes da emulsão foi de aproximadamente 2 minutos. A massa de água destilada adicionada ao reator teve como objetivo completar o volume reacional.

Após a temperatura do meio reacional voltar a 85 °C, foi adicionada ao reator uma carga de 30 g de monômero (estireno). Em seguida, foi feita a adição da solução de iniciador e conectou-se a mangueira de alimentação de monômero (estireno) ou da mistura de monômeros (estireno/DVB, estireno/cardanol, estireno/1-octeno, estireno/benzoato de vinila) ao reator. Por fim, ajustou-se a bomba para uma vazão de alimentação de 0,04 L/h. O início da polimerização em emulsão é considerado no instante em que se conecta a mangueira de alimentação do monômero (ou da mistura de monômeros), ao reator. A reação de polimerização em emulsão com vazão de alimentação controlada teve sempre a duração total de 2 horas.

Ao término da etapa de emulsão alimentada, a reação de emulsão prosseguiu por mais 2 horas, para garantir o recobrimento das partículas, totalizando assim 4 horas da etapa de emulsão. Assim, a polimerização simultânea em suspensão e emulsão ocorre por um tempo total de 6 horas: 2 horas da etapa de suspensão, 2 horas de emulsão alimentada e 2 horas de emulsão. Terminada a reação de polimerização simultânea, ajustava-se a temperatura do reator para 25 °C. Ao atingir essa temperatura,

o reator era desmontado e separava-se o sobrenadante da fase decantada (polímero casca-núcleo). O polímero formado era então filtrado a vácuo e lavado com água destilada. Em seguida, o polímero era levado à estufa a vácuo, por uma semana, para secar. Os monômeros utilizados nas reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão foram o estireno, divinilbenzeno (DVB), cardanol, benzoato de vinila e 1-octeno.

### 3.1.3.2. Polimerização em Massa

Antes de iniciar as reações para obtenção das partículas casca-núcleo, foi necessário avaliar a reatividade do estireno com os comonômeros selecionados e que iriam constituir a composição da casca. Para avaliar se os comonômeros copolimerizavam com o estireno de forma eficiente, foram realizados estudos cinéticos de reações de polimerização em massa, variando o percentual em massa do comonômero na receita. Para isso, foram testados percentuais em massa de comonômero de 1% e 5%.

As polimerizações em massa foram realizadas em 12 tubos de ensaio, cada tubo correspondendo a um reator em que ocorria a polimerização em massa. Para o acompanhamento do comportamento cinético da reação, a reação em cada tubo era interrompida em tempos específicos com a adição de 15 gotas de uma solução alcóolica de hidroquinona (1% (p/v)), que tem a função de interromper a reação de polimerização. Os tempos em que as reações foram interrompidas foram: 10 min, 20 min, 30min, 40 min, 50min, 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30 e 4h. As condições reacionais empregadas nas polimerizações em massa estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Condições reacionais empregadas para estudo cinético das reações de polimerização em massa entre o estireno e os comonômeros: DVB, 1-octeno, benzoato de vinila e cardanol. Mistura reacional (de monômero e iniciador) preparada para 12 tubos de ensaio.

Reagentes	Quantidades
Peróxido de Benzofila (BPO)	6 g
Estireno	100% em massa: 150 g 95% em massa: 142,5 g
1-octeno Divinilbenzeno (DVB) Benzoato de vinila Cardanol	5% em massa: 7,5 g
<b>Temperatura de reação</b>	<b>85 °C</b>
<b>Tempo de reação</b>	<b>4 horas</b>

Como cada tubo de ensaio corresponde a um reator onde ocorre a polimerização em massa, e cada reator corresponde a um determinado tempo na curva de conversão, foi então preparada inicialmente uma solução de iniciador (BPO) solubilizada no monômero ou na mistura de monômero e comonômero. Preparada a solução, esta foi distribuída igualmente em 12 tubos de ensaio, de modo que cada tubo contivesse o mesmo volume. Em seguida, os tubos foram colocados em um banho de aquecimento a 85 °C, contendo etileno glicol. A adição dos tubos ao banho marcou o início da polimerização em massa, pois o iniciador (BPO) só é ativado termicamente. Após 10 minutos do início da reação, pesava-se rapidamente o tubo de ensaio que continha o meio reacional, adicionava-se a solução de hidroquinona e anotava-se novamente a massa. Esse procedimento foi repetido para todos os tubos de ensaio nos respectivos tempos de reação.

## **3.2. Técnicas de Caracterização das Partículas Poliméricas**

### **3.2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)**

A Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) foi utilizada para determinação das massas molares ponderais médias e numéricas médias ( $\overline{Mw}$  e  $\overline{Mn}$ , respectivamente) e do índice de polidispersão (IP) dos materiais produzidos. A massa molar ponderal média ( $\overline{Mw}$ ) leva em consideração a massa molar de todas as cadeias poliméricas presentes no produto final. Assim, a massa molar de cada fração produzida contribui de maneira ponderada para o cálculo da massa molar ponderal média (CANEVAROLO, 2002). A massa molar numérica média ( $\overline{Mn}$ ) é a massa molar de todas as cadeias poliméricas, tomando-se como referência o número total de cadeias presentes na mistura. A razão entre a massa molar ponderal média e a massa molar numérica média ( $\overline{Mw} / \overline{Mn}$ ) corresponde ao índice de polidispersão (IP). O IP é uma medida do grau de dispersão das cadeias poliméricas em uma amostra; quando esse valor é igual a 1, todas as cadeias possuem o mesmo comprimento e o polímero é dito monodisperso. Quando IP é maior do que 1, a amostra polimérica possui cadeias com comprimentos diferentes e o polímero é polidisperso. A distribuição de massas molares pode ser larga ou estreita. Quando o IP é próximo de 1, diz-se que a distribuição é estreita, caso contrário, diz-se que a distribuição é larga.

A técnica de GPC é amplamente utilizada para determinação da distribuição de massas molares e de massas molares médias de uma amostra polimérica. Ela é baseada no fracionamento de uma amostra solubilizada em um solvente (chamado de fase móvel). A solução é injetada em colunas empacotadas, que contém um recheio de resina porosa (também conhecida como “gel”), com distribuição de tamanhos de poros bem definida (BRAUN,2005). Normalmente é utilizado como recheio da coluna (fase estacionária) um copolímero de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (CANEVAROLO, 2002). A técnica

de GPC difere de outras técnicas de cromatografia porque não é a interação entre as moléculas do analito solubilizado e a fase estacionária que é responsável pelo fracionamento da amostra, mas são os diferentes volumes hidrodinâmicos das moléculas com diferentes massas molares que permitem o fracionamento (BRAUN, 2005).

Ao injetar a solução de amostra na coluna, esta é eluída pelo mesmo solvente em que foi solubilizado. As moléculas de menores massas molares (volume hidrodinâmico pequeno) permeiam a coluna, difundindo-se pelos poros do recheio (fase estacionária) e pelos interstícios (volumes intersticiais entre uma partícula do recheio e outra), percorrendo assim um caminho maior que o percorrido pelas moléculas que possuem um maior tamanho. As moléculas maiores percorrem a coluna pela parte de fora do recheio pois, por possuírem um tamanho maior que o diâmetro dos poros da fase estacionária, não conseguem penetrá-los, resultando em um tempo de retenção menor. Assim, as cadeias poliméricas de maior tamanho (massas molares elevadas) são eluídas e detectadas antes das cadeias de tamanhos menores (menores massas molares), que possuem um tempo de retenção maior (BRAUN, 2005). Pode-se conseguir uma separação efetiva das moléculas com diferentes massas molares, que constituem uma amostra polimérica, com a escolha correta da distribuição dos tamanhos dos poros da fase estacionária.

Para detectar as massas molares das cadeias poliméricas eluídas da coluna cromatográfica, são necessários detectores localizados após a saída da coluna. Esses detectores contabilizam quantas moléculas de polímero deixam a coluna em um dado intervalo de tempo. O detector utilizado nas análises foi o de índice de refração (IR), que mede a diferença de índice de refração entre o solvente puro e a solução que contém as macromoléculas (BRAUN, 2005). Na Figura 7 está representado um esquema simplificado de um equipamento GPC.

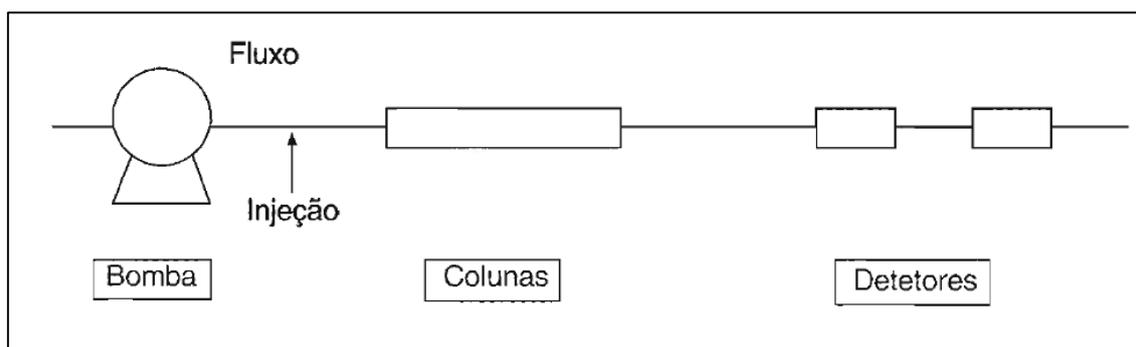


Figura 7: Esquema simplificado da cromatografia de permeação em gel (GPC) (CANEVAROLO, 2002).

Como a técnica de GPC não é uma técnica absoluta, é necessário calibrar o equipamento para determinar a distribuição de massa molar da amostra. A calibração é realizada utilizando-se padrões

com uma distribuição de massa molar estreita e conhecida. O equipamento usado no presente trabalho foi calibrado com padrões de PS com massas molares diferentes e definidas. A curva de calibração das colunas é gerada com os padrões e usada para calcular a massa molar da amostra polimérica.

Para conduzir as análises, foi necessário solubilizar 3 mg das partículas poliméricas em 3 ml de THF (tetrahidrofurano), para obter uma solução de concentração 1 mg/ml. Em seguida, as soluções dos polímeros eram filtradas com membranas de teflon com tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . 200  $\mu\text{l}$  dessas soluções filtradas eram injetadas no cromatógrafo GPC Max - Viscotek (VE 2001), equipado com um detector refratométrico Viscotek (VE 3580) e com duas colunas Phenomenex com recheio de poli(estireno-co-divinilbenzeno). O equipamento foi calibrado utilizando padrões de PS com massas molares na faixa de 500 a  $3 \times 10^6$  Da. As análises foram conduzidas a 40 °C, utilizando THF como fase móvel. A vazão de injeção das amostras analisadas foi de 1 ml/min.

### 3.2.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) analisa transições térmicas quando uma amostra polimérica é exposta a ciclos de aquecimento e resfriamento sob atmosfera inerte. Esta técnica foi utilizada para avaliar as transições térmicas dos suportes produzidos. Como resposta, são obtidas a temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ), a temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do material, que é a temperatura a partir da qual as cadeias poliméricas da fase amorfa adquirem certa mobilidade e tornam-se mais flexíveis e elastômericas. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) é um parâmetro que depende da natureza química do polímero, da configuração, do grau de cristalinidade, do comprimento da cadeia lateral e do grau de ramificação da cadeia (BRAUN, 2005).

A técnica de DSC consiste na utilização de duas cápsulas de alumínio (também chamadas de panelas), em que são colocadas a amostra polimérica e a referência (no caso, vazia). Essas cápsulas são então postas em um forno programado para garantir que as duas cápsulas sejam aquecidas com uma mesma taxa de aquecimento, tendo em vista que a cápsula que contém a amostra requer mais calor para manter o aumento de temperatura à mesma taxa da cápsula de referência (BRAUN, 2005). Como resultado da análise, é gerado um gráfico (termograma) de diferença de fluxo de calor entre a amostra e a referência, como função da temperatura.

Polímeros amorfos apresentam um termograma com apenas uma temperatura característica de transição vítrea. Os polímeros semicristalinos apresentam termogramas que contém picos de temperatura de fusão cristalina e de cristalização ( $T_m$  e  $T_c$ , respectivamente), além da transição vítrea ( $T_g$ ).

A transição vítrea é classificada como uma transição de segunda ordem, pois, durante o processo, não envolve mudança verdadeira de estado da amostra. As transições características de fusão e cristalização, e que envolvem o desenvolvimento de calor latente, são classificadas como transições de primeira ordem (BRAUN, 2005).

Para padronizar a determinação da  $T_g$ ,  $T_m$  e  $T_c$ , é necessário primeiramente, submeter a amostra a ciclos de aquecimento e resfriamento, para apagar a memória térmica do material, pois a posição dos picos referentes a essas temperaturas dependem do histórico térmico da amostra. Só a partir do segundo ciclo de aquecimento e resfriamento é que são obtidos os valores desses parâmetros.

As análises de DSC, usada para a determinação das  $T_g$  dos suportes com morfologia casca-núcleo, foram conduzidas em um calorímetro DSC Perkin Elmer (8500). Para essa análise, aproximadamente 10 mg de cada amostra foram adicionadas em cápsulas de alumínio. Em seguida, essas cápsulas foram fechadas e seladas. Como referência, utilizou-se uma cápsula de alumínio vazia (sem amostra). As cápsulas contendo a amostra e a referência foram então submetidas a ciclos de aquecimento/resfriamento na faixa de temperaturas de 0 °C a 200 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Só após o primeiro ciclo de aquecimento/resfriamento, que tem como objetivo apagar a memória térmica do material, é que os termogramas das amostras foram obtidos (ou seja, no segundo ciclo de aquecimento/resfriamento).

### **3.2.3. Análise Termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica (TGA) é uma análise destrutiva, utilizada para estudar a estabilidade térmica de uma amostra sob condições inertes (como no caso da degradação espontânea da cadeia.) e sob a presença de oxigênio (como na oxidação). A técnica de TGA é também utilizada para avaliar a presença de solvente, monômero residual ou outro componente volátil que esteja presente na amostra polimérica (BRAUN, 2005). Em nossos estudos, essa análise foi utilizada para identificar se os monômeros selecionados (estireno, divinilbenzeno, benzoato de vinila, 1-octeno e cardanol) copolimerizavam em reações de polimerização em massa, para que pudessem ser utilizados como comonômeros nas reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão.

O princípio da técnica de TGA é o monitoramento da perda de massa de uma amostra em condições controladas, em função do aumento da temperatura durante a análise. O equipamento que realiza essa análise consiste de um forno, uma balança de precisão, um cadinho feito de material inerte (no caso, platina) onde é colocada a amostra, termopares que fazem o monitoramento da temperatura e um sistema de passagem de gás (NETO, 2013). A análise de aproximadamente 10 mg de cada amostra foi conduzida em um equipamento Perkin Elmer STA 6000, com temperatura variando de 50 °C a 700

°C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera inerte de nitrogênio (N<sub>2</sub>). A massa de cada amostra analisada foi colocada no cadinho e este era posto na balança de alta precisão.

Muitos fatores podem afetar os resultados das análises de TGA, como a taxa de aquecimento e o tamanho da amostra (BRAUN, 2005). O tamanho da partícula da amostra, sua morfologia e a taxa do fluxo do gás podem afetar a análise, pois os gases presentes durante a análise podem ou não reagir com a amostra, resultando em efeitos diretos nas variações de massa (NETO, 2013). Como resposta de análise, é fornecido um gráfico de massa (termograma) como função da temperatura.

### **3.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com o objetivo de avaliar as características morfológicas dos suportes casca-núcleo produzidos nas reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão. Essa é uma técnica que tem como princípio a utilização de um feixe de elétrons que varre a superfície da amostra e transmite o sinal do detector a uma tela catódica, cuja velocidade de varredura é sincronizada com a varredura do feixe incidente (DEDAVID *et al.*, 2007). A imagem que é formada na análise é consequência da interação do feixe incidente com a superfície da amostra, que resulta na produção de elétrons e fótons que são coletados por detectores para formar um sinal de vídeo (imagem) (DEDAVID, *et al.*, 2007). Diferentes sinais são emitidos pela amostra para formar a imagem gerada pela análise de MEV. Os sinais mais utilizados para a geração de imagens são os sinais originários dos elétrons secundários ou dos elétrons retroespalhados. Os elétrons secundários (SE), são elétrons de baixa energia (< 50eV) e que formam imagens de alta resolução (3nm - 5nm). Eles são resultado da interação do feixe eletrônico com o material da amostra. Os elétrons retroespalhados (BSE) são elétrons com energia que varia entre 50 eV e a energia do elétron primário. Os elétrons retroespalhados de alta energia, por resultarem de colisões elásticas, são provenientes da camada superficial da amostra e, por esse motivo, não fornecem informações sobre a profundidade da imagem. O sinal dos elétrons retroespalhados resulta de interações que ocorrem no interior da amostra e a imagem gerada por esses elétrons fornece informações sobre o contraste, como imagem topográfica (contraste em função do relevo) e imagem sobre composição (contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra) (DEDAVID *et al.*, 2007).

As análises dos suportes produzidos foram conduzidas em um microscópio eletrônico de varredura Fei Company, modelo Quanta 2000, operando com tensão máxima de 30kV, alto vácuo e com detector de sinais, para geração de imagem a partir de elétrons secundários (SE). Para a análise no MEV, as amostras, após secas em estufa a vácuo, foram depositadas sobre uma fita dupla face de carbono. Essa fita que continha a amostra foi fixada em um suporte de alumínio (“stub”). Após a fixação no suporte de alumínio, as amostras passaram por um processo de metalização com ouro, para que pudessem ser

analisadas no MEV. As micrografias geradas foram processadas em um analisador de imagens Fei Company (BESTETI, 2009; PINTO, 2013). As condições de operação utilizadas para obtenção das imagens como, tamanhos de “spot”, distância de trabalho (WD) e ampliações das regiões observadas, podem ser observadas nas legendas das micrografias que se encontram no Capítulo 4.

### **3.2.5. Microscopia Óptica (MO)**

Assim como no caso da análise de MEV, a técnica de microscopia óptica (MO) foi utilizada com o objetivo de caracterizar morfológicamente as partículas poliméricas casca-núcleo produzidas. Para tal, foi utilizado um microscópio óptico binocular Nikon, modelo SMZ800, com capacidade de ampliação de 50x, acoplado a uma câmera digital Nikon Coolpix 995, que permite a digitalização das imagens para uma melhor visualização da morfologia das partículas.

### **3.2.6. Distribuição de Tamanho de Partícula (DTP) - Malvern**

Para determinação da distribuição de tamanhos das partículas poliméricas obtidas na polimerização simultânea em suspensão e emulsão foi utilizado o equipamento Malvern Mastersizer 2000 com módulo de análise por via úmida Malvern Hydro 2000S, que possui faixa de limite de detecção de 0,02 – 2000  $\mu\text{m}$ . A técnica tem como base a medida da intensidade da luz espalhada causada pela passagem de um feixe de laser por uma amostra dispersa (MALVERN PRODUCTS, 2013). Para realização desta análise, uma determinada massa de amostra polimérica foi inserida em um compartimento do equipamento (até obter uma obscuridade mínima de 15%) que continha água recirculante. Um sistema de agitação garantia a dispersão e homogeneização das partículas da amostra no meio. Por intermédio de uma bomba, as partículas dispersas em água eram conduzidas até os detectores posicionados no interior do equipamento, onde eram realizadas as leituras (Pinto, 2013). Para cada suporte enzimático produzido, as análises de DTP foram realizadas em triplicata.

### **3.2.7. Distribuição de Tamanhos de Partícula (DTP) - ZetaSizer-Nano**

Para determinar as distribuições de tamanhos de partículas presentes nos sobrenadantes ao final das reações, foram realizadas análises em triplicata no equipamento Malvern Zetasizer- nano ZS, que possui como limite de detecção, partículas com diâmetros na faixa de 0,3 nm-10  $\mu\text{m}$ . Essa técnica tem como princípio o espalhamento dinâmico da luz devido à difusão das partículas que se movem seguindo

um movimento Browniano. Através da medida do espalhamento da luz, calcula-se o tamanho e a distribuição de tamanho da partícula pela aplicação da relação de Stokes-Einsten (MALVERN PRODUCTS, 2013). A análise foi realizada utilizando-se 1 gota do sobrenadante de cada reação, que era adicionada a uma cubeta contendo água destilada e microfiltrada. A cubeta era então inserida no equipamento, dando início à análise. Cada sobrenadante foi analisado em triplicata.

### 3.2.8. Ângulo de Contato

A determinação do ângulo de contato dos suportes enzimáticos em relação a água foi realizada com o objetivo de avaliar o grau de hidrofobicidade das partículas com diferentes composições de casca produzidas. As análises foram conduzidas em um tensiômetro KrussProcessor K100. Para determinação do ângulo de contato, foi necessário primeiramente preparar pastilhas das amostras, utilizando uma prensa hidráulica. As pastilhas eram então acopladas à balança do equipamento por intermédio de uma pinça metálica. Como solvente da análise foi utilizada água destilada, que era adicionada a um recipiente cilíndrico de vidro e então colocada na plataforma elevatória do equipamento. A análise foi realizada com uma velocidade de medição de 1 mm/min e velocidade de detecção de superfície de 3 mm/min, com profundidade de imersão de 10 mm. Essa técnica utiliza o método da placa para determinação da tensão superficial, que consiste na utilização de um líquido com uma tensão superficial conhecida (em nosso caso, água) e uma placa feita do material a ter seu ângulo de contato investigado. A análise inicia-se assim que o disco feito do material da amostra (placa) entra em contato com o líquido de tensão superficial conhecida. À medida que o líquido entra em contato com a placa, a tensão (F, força) é registrada pela balança. Como o diâmetro do disco (placa) (D), a largura (l) e a tensão superficial do líquido ( $\sigma$ ) são conhecidos, é possível então calcular o ângulo de contato do material ( $\theta$ ) pela Equação 1.

$$\cos \theta = \frac{F}{((2 \times l + 2 \times D)) \times \sigma} \quad (1)$$

Equação 1: Equação utilizada para cálculo do ângulo de contato.

Por definição, quando o ângulo de contato é maior que 90° ( $\theta > 90^\circ$ ), não ocorre a molhabilidade do sólido pelo líquido e a superfície é considerada hidrofóbica. Quando o ângulo de contato é menor que 90° ( $\theta < 90^\circ$ ), o sólido é ao menos parcialmente molhado pelo líquido e a superfície é considerada hidrofílica (LUZ *et al.*, 2008).

### 3.2.9. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

A técnica de espectroscopia no infravermelho é uma importante ferramenta utilizada para caracterização de amostras poliméricas, pois permite a análise tanto de polímeros solúveis quanto de polímeros reticulados e insolúveis. A técnica é sensível à composição estrutural, pois permite a identificação de grupamentos funcionais característicos de uma determinada molécula, grupos terminais e composição de copolímeros (BRAUN, 2005).

A energia dos fótons que constituem o feixe de infravermelho é da ordem de 1.6 a 0,001eV, suficiente para promover movimentos vibracionais nas moléculas, porém insuficiente para induzir transições eletrônicas (BRAUN, 2005). Como as transições vibracionais são ativas no infravermelho apenas quando ocorre uma variação do momento de dipolo da molécula causada durante o movimento vibracional, a intensidade da interação entre a molécula e a radiação no infravermelho depende da estrutura da molécula, da sua simetria e de sua distribuição eletrônica.

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para determinação da composição dos suportes casca-núcleo sintetizados e para avaliar se de fato a copolimerização havia ocorrido. As análises foram realizadas em estado sólido e na temperatura ambiente no espectrômetro Thermo Scientific, Nicolet 6700, equipado com detector MCT/B Smart Orbit.

### 3.2.10. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro e Volume Específico de Poros - Isoterma de BET

Para a determinação da área específica, diâmetro médio de poro e volume específico de poros das partículas poliméricas foi utilizado o método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET), que consiste na determinação das isotermas de adsorção física de gases (BESTETI, 2009). Esse método permite determinar a quantidade de gás adsorvido para formar uma monocamada sobre a superfície da partícula medida. A partir da isoterma de BET, o número de moléculas do adsorvato (gás) necessárias para que se possa formar a monocamada pode ser determinado. Como a área ocupada pela molécula do gás é conhecida (ou pode ser estimada), é então possível calcular a área específica das partículas poliméricas (SANTANA *et al.*, 2012). A técnica de BET é utilizada para determinação da área na faixa de mesoporos (20 Å a 500 Å) e microporos (< 20 Å), empregando o nitrogênio (N<sub>2</sub>) como adsorvato para formação da monocamada (Salis *et al.*, 2003). Para a determinação do diâmetro médio e do volume específico de poros, utilizou-se o método de BJH, baseado na equação de Kelvin, que admite o esvaziamento progressivo dos poros cheios de líquido com a diminuição da pressão (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Para realizar as análises de BET, pesaram-se aproximadamente 1 g de cada amostra polimérica em um balão, que foi vedado e acoplado ao equipamento. Em seguida, a amostra foi submetida a um pré-tratamento térmico de 60 °C a vácuo, com o objetivo de eliminar quaisquer impurezas voláteis presentes na superfície das partículas. Ao término da etapa de pré-tratamento, a massa da amostra foi novamente pesada, para determinar a massa exata do polímero. O balão contendo então a massa de amostra pré-tratada foi novamente acoplada ao equipamento, sendo então resfriado por intermédio de um dewar contendo N<sub>2</sub> líquido (PINTO, 2013). Nessa etapa, era feita a ativação do sistema de vácuo e iniciava-se a injeção N<sub>2</sub>, promovendo então a adsorção do gás na superfície das partículas. Ao final da análise, utilizando-se um programa computacional específico, eram determinados os valores de área específica, distribuição e tamanho médio de poros (PINTO, 2013). As análises de BET foram realizadas no equipamento Micrometics, modelo ASAP 2020.

### **3.2.11. Análise Gravimétrica para Determinação da Conversão e do Teor de Sólidos**

Análises gravimétricas foram usadas para avaliar o comportamento cinético da reação do monômero ao longo da corrida, assim como determinar o teor de sólidos presentes nos sobrenadantes e o rendimento final de cada reação.

Para o acompanhamento da cinética das reações de polimerização, alíquotas do meio reacional foram recolhidas em tempos específicos com a utilização de um “eppendorf” preso à ponta de uma haste. Essas alíquotas foram então vertidas em cápsulas de alumínio contendo 8 gotas de uma solução aquosa de hidroquinona (1% (m/v)), que foi previamente preparada. Em seguida, as cápsulas foram conduzidas a uma estufa de recirculação com temperatura de 40 °C até atingirem massa constante. A conversão correspondente a cada tempo de reação analisado foi calculado através da Equação 14 apresentada no Anexo A

O teor de sólidos foi calculado por meio da análise gravimétrica do sobrenadante ao final da reação de polimerização. Para tal, ao término da reação, o conteúdo reacional foi retirado do reator e vertido em um bécher de vidro. Aguardaram-se alguns minutos, até que as partículas poliméricas decantassem, e retirou-se uma alíquota do sobrenadante (15 gotas), que foi colocada em uma cápsula de alumínio contendo 10 gotas de solução aquosa 1% (m/v) de hidroquinona (solução inibidora). Em seguida, a cápsula foi levada à estufa de recirculação a 40°C até massa constante. As análises foram realizadas em triplicata. O teor de sólidos foi calculado com auxílio da Equação 2

$$\text{Teor de sólidos} = \frac{m_{\text{seca}} - m_{\text{cápsula}} - m_{\text{hidroquinona}}}{m_{\text{úmida}} - m_{\text{cápsula}} - m_{\text{sol.hidroquinona}}} \quad (2)$$

Equação 2: Utilizada para cálculo do teor de sólidos.

Onde  $m_{\text{seca}}$  é a massa da cápsula com a amostra seca;  $m_{\text{cápsula}}$  é a massa da cápsula de alumínio;  $m_{\text{hidroquinona}}$  é a massa de hidroquinona contida na solução aquosa;  $m_{\text{úmida}}$  é a massa da cápsula contendo a amostra úmida;  $m_{\text{sol. hidroquinona}}$  é a massa da solução de hidroquinona adicionada à cápsula.

O mesmo procedimento utilizado para o estudo cinético das polimerizações simultâneas em suspensão e emulsão, foi utilizado para o estudo cinético das polimerizações em massa.

### **3.3. Etapa de Imobilização Enzimática por Adsorção Física**

Obtidos os suportes poliméricos, estes foram utilizados para imobilizar a enzima comercial lipase B de *Candida antarctica*, para dar origem ao biocatalisador (enzima imobilizada). O procedimento experimental utilizado, assim como os materiais utilizados, são descritos a seguir.

#### **3.3.1. Materias**

##### **3.3.1.1. Unidade experimental**

Para realizar a imobilização da enzima nos suportes poliméricos casca-núcleo, foi montada uma unidade experimental com um bécher, uma placa de aquecimento com agitação magnética, uma barra magnética e uma cuba, utilizada para manter a temperatura de imobilização em torno de 4 °C. O esquema da unidade experimental utilizada durante os ensaios de imobilização está apresentado na Figura 8.

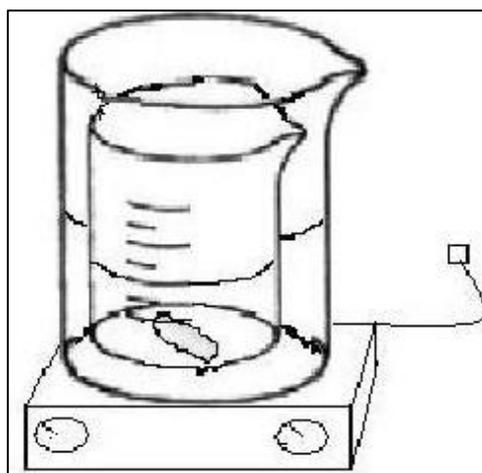


Figura 8: Esquema da unidade experimental utilizada para a imobilização dos suportes (PINTO, 2013).

### 3.3.1.2. Reagentes

Os reagentes utilizados para imobilização da lipase sobre os suportes estão apresentados a seguir. Os reagentes foram utilizados como recebidos do fabricante e não passaram por nenhuma etapa de purificação.

- 1) Água destilada, utilizada no procedimento de lavagem dos suportes e utilizada também para o preparo das soluções utilizadas na imobilização;
- 2) Etanol P.A fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99,8%. Utilizado no procedimento de lavagem dos suportes e na determinação da atividade de esterificação dos biocatalisadores;
- 3) Fosfato de sódio monobásico P.A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99%. Utilizado para o preparo da solução tampão de concentração 25 mM e 5 mM. Usado na imobilização, lavagem dos suportes e na dosagem da atividade de hidrólise do biocatalisador (suporte imobilizado);
- 4) Hidróxido de sódio P.A fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99%. Utilizado na preparação da solução de concentração 0,25 M (para neutralizar a solução tampão de fosfato de sódio 25 mM empregada na etapa da imobilização) e no preparo da solução de concentração de 0,02 M (necessária para a determinação da atividade de esterificação dos biocatalisadores);
- 5) *p*-nitrofenil laurato, fornecido pela Fluka, com pureza mínima de 98%. Utilizado no preparo da solução de substrato utilizada na etapa de imobilização dos suportes;
- 6) Dimetil sulfóxido (DMSO), fornecido pela Tedia Company Inc., com pureza mínima de 99,9%, grau UV/HPLC. Utilizado como um dos constituintes da solução de substrato da etapa de imobilização dos suportes;

- 7) Acetonitrila, fornecida pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99,9%, grau UV/HPLC. Utilizado como um dos constituintes da solução de substrato da etapa de imobilização;
- 8) Lipozyme® CALB L, Lipase B de *Candida Antarctica* (CAL B), na forma solúvel, fornecida pela empresa Novozymes. Enzima utilizada na imobilizada dos suportes;
- 9) Ácido oleico P.S, fornecido pela Vetec Química Fina, utilizado na determinação da atividade de esterificação dos biocatalisadores;
- 10) Solução de Bradford, fornecido pela empresa Bio Rad, utilizado na cinética de imobilização baseada na dosagem de proteína presente no sobrenadante colhido ao longo do tempo durante as imobilizações;
- 11) Albumina do soro bovino (BSA) (2 mg/ml), fornecido pela Bio Rad. Utilizada para construção da curva padrão no espectrofotômetro, no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm para análise da cinética de imobilização baseada na dosagem de proteína;

### **3.3.2. Metodologia Experimental (Imobilização)**

Para imobilização da CAL-B por adsorção física nos suportes poliméricos casca-núcleo, primeiramente os suportes passaram por um pré-tratamento conduzido para facilitar a penetração da suspensão enzimática no interior do suporte no momento da imobilização, diminuindo o grau de hidrofobicidade do mesmo (PINTO, 2013). Esse pré-tratamento consistiu na lavagem dos suportes com etanol e água. Para tal, 1 g de cada suporte foi colocado em contato com 10 ml de etanol contidos em um bécher, por um período de 30 minutos. Terminado o período de 30 minutos, o etanol foi retirado com auxílio de uma pipeta pasteur. Em seguida, os suportes foram lavados com um volume de 10 ml de água destilada até a completa remoção de etanol, indicado pela ausência do odor típico no suporte. Por fim, os suportes foram lavados com solução tampão de fosfato de sódio 5 mM previamente preparada e filtrados. Após a lavagem, os suportes foram guardados em tubos tipo falcon na geladeira até o momento em que iriam ser utilizados na imobilização.

Terminada a etapa de lavagem dos suportes, foram preparadas as seguintes soluções utilizadas na imobilização: (i) soluções tampão de fosfato de sódio, com pH 7, nas concentrações de 25 mM e 5 mM (esta última obtida através da diluição da solução tampão de concentração de 25 mM); (ii) solução de hidróxido de sódio a 0,25M, para ajustar o pH da solução tampão de fosfato de sódio até pH 7 e (iii) solução de substrato de p-nitrofenil laurato. As condições utilizadas no preparo da solução de substrato empregada na imobilização estão indicadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições utilizadas para o preparo da solução de substrato empregada na etapa de imobilização dos suportes.

Solução de Substrato		
Constituintes	Quantidades	Volume final da solução
<i>p</i> -nitrofenil laurato	0,016 g	20 ml
DMSO	10 ml	
Acetonitrila	10 ml	

Para dar início ao processo de imobilização da lipase sobre os suportes, foi necessário primeiramente, medir a atividade inicial da enzima comercial (extrato de CAL-B comercial), por intermédio do método espectrofotométrico, em que se adicionava a uma cubeta de quartzo de 1,00 mm de caminho óptico, 2,2 ml de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7, e 0,25 ml da solução de substrato. Essa cubeta foi acoplada ao espectrofotômetro e então era feita a linha de base por até 0,5 min no comprimento de onda de 412 nm. Após esse tempo, adicionavam-se à cubeta 0,05 ml da suspensão do extrato comercial diluída 500 vezes, prosseguindo-se com a leitura no UV-vis. Esse procedimento inicial teve como objetivo preparar 10 ml de uma suspensão diluída da enzima comercial com atividade inicial de 100 U (U ou UI corresponde a unidade de atividade enzimática) para ser imobilizado em 1 g de suporte. Para o preparo da suspensão diluída de 100 U/g<sub>suporte</sub>, colheu-se uma alíquota da enzima comercial concentrada (extrato comercial) que foi diluída em um volume determinado de tampão de fosfato de sódio de concentração 5mM e pH 7. As imobilizações foram realizadas em meio com baixa força iônica, meio que continha tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7, pois segundo FERNANDÉZ-LAFUENTE *et al.* 1998, sob baixa força iônica, a velocidade de imobilização de lipases é máxima. Em seguida, 10 ml da suspensão diluída do extrato, com atividade inicial de 100 U/g<sub>suporte</sub>, foram adicionados a um bécher contendo 1 g de suporte, sendo então a agitação magnética ligada. Esse momento foi considerado o início do processo de imobilização. O sistema era mantido sob baixa e constante agitação por 25 horas a uma temperatura de aproximadamente 4 °C. A imobilização foi realizada a baixa temperatura para prevenir a desnaturação da enzima.

Em tempos especificados (0 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h e 25h) foram colhidas alíquotas do sobrenadante para acompanhar a cinética de imobilização por meio da medição da atividade da enzima presente no sobrenadante. Cerca de 1 minuto antes de colher as alíquotas, a agitação era desligada para garantir a decantação das partículas poliméricas (PINTO, 2013). Ao término das 6 horas do processo de imobilização, interrompia-se a agitação e retirava-se o bécher que continha as partículas poliméricas e a suspensão enzimática do banho de gelo, levando-o a uma câmara frigorífica com temperatura de 4 °C, onde era mantido em uma placa agitadora, com agitação baixa, até completar as 25 horas de imobilização. Ao final do processo de imobilização, os suportes imobilizados com a enzima (agora chamados de biocatalisadores) eram lavados e filtrados com água destilada, para remoção das possíveis

enzimas não adsorvidas no suporte. Em seguida, os biocatalisadores eram levados ao dessecador, onde permaneciam por aproximadamente uma semana, até a secagem total das amostras. Após secos, os biocatalisadores eram guardados em tubos de vidro, devidamente vedados, e levados a geladeira até o momento de caracterização (PINTO, 2013).

### 3.3.2.1. Avaliação da Cinética de Imobilização Baseada na Atividade de Hidrólise da Enzima Solúvel

A cinética do processo de imobilização foi acompanhada (0 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h e 25 h) por meio da medida da atividade de hidrólise da enzima solúvel ainda presente no sobrenadante durante a imobilização. A atividade de hidrólise da enzima solúvel foi determinada por meio do método espectrofotométrico, pela formação do *p*-nitrofenol, um cromóforo de coloração amarela resultante da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato catalisada pela enzima (CAL-B) na forma solúvel como mostrado na Figura 9. Assim, a quantidade de *p*-nitrofenol formada pode ser relacionada à quantidade de enzima presente no meio.

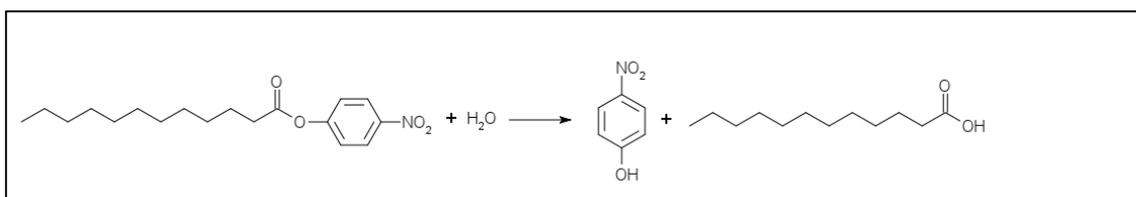


Figura 9: Reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato.

Para a utilização do método espectrofotométrico, foi necessário primeiramente realizar a construção de uma curva padrão de *p*-nitrofenol, que relaciona soluções de diferentes concentrações (em tampão fosfato de sódio 25 mM a 30 °C) com suas respectivas absorvâncias. O fator linear obtido com a construção da curva padrão realizada no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 412 nm foi de 0,102641  $\mu\text{mol/ml}$ .

Para determinação da atividade de hidrólise da enzima solúvel, adicionam-se a uma cubeta de quartzo de 1.00 mm de caminho óptico 2,2 ml de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH 7) e 0,25 ml da solução de substrato. Inseria-se a cubeta no espectrofotômetro, mantido a 30 °C, para correr a linha de base por aproximadamente 0,5 min. Em seguida, adicionaram-se à cubeta 0,05 ml do sobrenadante da imobilização, iniciando-se a reação de hidrólise que leva à formação da espécie cromófora *p*-nitrofenol. O progresso da reação foi acompanhado no espectrofotômetro pela variação da absorvância no comprimento de onda de 412 nm. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada alíquota do sobrenadante colhida durante a imobilização dos suportes.

Por meio desse procedimento, foi possível calcular a atividade de hidrólise da enzima solúvel para cada ponto ao longo de uma imobilização e construir um gráfico de atividade como função do tempo, representando a cinética de imobilização. A medida que a enzima é imobilizada no suporte, a atividade do sobrenadante diminui. A Equação 3 foi utilizada para o cálculo das atividades de hidrólise da enzima solúvel.

$$A_{hidrolise\ da\ enzima\ solúvel} = \frac{(Abs/min) \times V_{final} \times f}{V_{amostra}} \quad (3)$$

Equação 3: Atividade de hidrólise da enzima solúvel (PINTO, 2013).

onde,  $A_{hidrolise\ da\ enzima\ solúvel}$  é a atividade de hidrólise da enzimas solúvel (UI/ml) ou (UI/g<sub>suporte</sub>), se o valor em UI/ml for multiplicado por 10, que corresponde ao volume de suspensão enzimática que foi utilizado na imobilização de 1g de suporte;  $Abs/min$  é o coeficiente angular da curva experimental de absorção em 412nm;  $V_{final}$  é o volume final do meio reacional (ml);  $f$  é o fator obtido da curva padrão de p-nitrofenol em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7 e a 30°C (0,102641 μmol/ml);  $V_{amostra}$  é o volume da amostra retirada do sobrenadante (ml).

A unidade internacional (UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 μmol de p-nitro fenol por minuto, nas condições do ensaio (BESTETI, 2011). Através da análise cinética baseada na atividade da enzima solúvel, é também possível obter a eficiência de cada imobilização, como mostrado na Equação 4.

$$\eta = \frac{A_{teo} \times 100}{A_e}, \text{ onde } A_{teo} = A_e - A_s \quad (4)$$

Equação 4: Cálculo para o eficiência de imobilização (PINTO, 2013).

Onde,  $\eta$  é a eficiência de imobilização (%);  $A_{teo}$  é a atividade da enzima adsorvida ao suporte (UI/g<sub>suporte</sub>);  $A_e$  é a atividade da suspensão enzimática no início do processo de imobilização (UI/g<sub>suporte</sub>);  $A_s$  é a atividade da enzima presente no sobrenadante ao final do processo de imobilização (UI/g<sub>suporte</sub>).

### 3.3.2.2. Atividade de Hidrólise do Biocatalisador

Os biocatalisadores, foram também caracterizados quanto à atividade para reações de hidrólise. Para tal, foi utilizado o método espectrofotométrico. Esse método, como no caso da determinação da atividade de hidrólise da enzima solúvel, consiste na dosagem da quantidade de p-nitrofenol formado através da reação de hidrólise do p-nitrofenil laurato catalisado pelo biocatalisador. O produto dessa reação, como já mencionado anteriormente, é um composto de coloração amarela. As reações de hidrólise foram conduzidas em um reator onde eram adicionados 9 ml da solução tampão de fosfato de sódio (25 mM e pH 7) e 1 ml da solução de substrato (solução de p-nitrofenil laurato). Em seguida, eram adicionados 10 mg do biocatalisador em cada reator. Esse momento era considerado como o início das reações de hidrólise. Essas reações eram conduzidas com temperatura controlada de 30°C e com agitação constante moderada (PINTO, 2013). Ao longo da reação, foram retiradas alíquotas de 1 em 1 minuto até aproximadamente 8 minutos. Cada alíquota foi adicionada em uma cubeta de quartzo, de 1.00 mm de caminho óptico, que foi por sua vez acoplada rapidamente à câmara do espectrômetro, que estava acoplada a um banho de aquecimento a uma temperatura de 30 °C. As leituras de absorvância foram realizadas no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 412 nm. As reações de hidrólise foram realizadas em triplicata. A equação utilizada para o cálculo de atividade está apresentada na Equação 5.

É importante lembrar que uma unidade de atividade enzimática (1UI ou 1U) corresponde à quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio utilizadas (PINTO, 2013).

$$A_{\text{hidrólise biocat.}} = \frac{(Abs/min) \times V_{\text{final}} \times f}{m_{\text{amostra}}} \quad (5)$$

Equação 5: Equação utilizada para cálculo da atividade de hidrólise dos biocatalisadores (PINTO, 2013).

onde,  $A_{\text{hidrólise biocat.}}$  é a atividade de hidrólise do biocatalisador (UI/g<sub>enzima imobil.</sub>);  $Abs/min$  é o coeficiente angular da reta obtida do ensaio de atividade de hidrólise do biocatalisador;  $V_{\text{final}}$  é o volume final do meio reacional (ml);  $f$  é o fator obtido da curva padrão de p-nitrofenol em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7) a 30 °C ( $0,102641\mu\text{mol} \cdot \text{Abs}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ); e  $m_{\text{amostra}}$  é a massa do biocatalisador (enzima imobilizada) (g).

Pela determinação da atividade de hidrólise dos biocatalisadores foi possível determinar outro parâmetro de imobilização, que é a retenção de atividade. A equação utilizada para esse cálculo encontra-se na Equação 6.

$$R_a = \frac{A_{\text{hidrólise biocat.}} \times 100}{A_{\text{teo}}}, \text{ onde } A_{\text{teo}} = A_e - A_s \quad (6)$$

Equação 6: Equação para cálculo da retenção de atividade do biocatalisador (PINTO, 2013).

onde  $R_a$  é a retenção de atividade do biocatalisador (%);  $A_{\text{hidrólise biocat.}}$  é a atividade de hidrólise do biocatalisador (enzima imobilizada) (UI/g<sub>enzima imobil.</sub>);  $A_{\text{teo}}$  é a atividade teórica da enzima que ficou adsorvida ao suporte (UI/g<sub>suporte</sub>);  $A_e$  é a atividade da suspensão enzimática no início da imobilização (UI/g<sub>suporte</sub>) e  $A_s$  é a atividade da enzima presente no sobrenadante (forma solúvel) ao final da imobilização (UI/g<sub>suporte</sub>).

### 3.3.2.3. Atividade de Esterificação do Biocatalisador

Os biocatalisadores foram também avaliados quanto à atividade de esterificação. Para tal, foi utilizado como substrato 10,1 ml de ácido oleico e 1,9 ml de etanol. Esses reagentes que compunham o substrato foram vertidos e homogeneizados (por agitação magnética) em um reator de vidro encamisado, com temperatura estabilizada de 40 °C. Em seguida, adicionaram-se ao reator 0,2 g de biocatalisador. Esse momento era considerado como o início da reação de esterificação. Nesse instante, o reator foi tampado com uma rolha de vidro esmerilhada para evitar perdas por evaporação de constituintes voláteis do meio reacional. Todas as reações foram realizadas na temperatura de 40 °C e com agitação magnética de aproximadamente 250 rpm (PINTO, 2013).

Ao longo das reações de esterificação foram retiradas alíquotas (em triplicata) de 100 µl do sobrenadante do meio reacional. Os tempos em que as alíquotas foram colhidas foram iguais a 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min e 60 min (PINTO, 2013). Cada alíquota retirada do meio reacional era adicionada a um bécher de plástico contendo 40 ml de uma mistura (1:1 em volume) de etanol e acetona. Essa mistura de etanol e acetona foi utilizada para extrair o ácido oleico presente no meio reacional, para que este pudesse ser dosado por titulação com solução NaOH (0,02 M) como solução titulante.

Os bécheres de plástico foram então conduzidos a um titulador automático, onde o ácido oleico do meio era dosado. Como o produto da reação de esterificação é um éster (oleato de etila), à medida que o éster se forma, o pH do meio reacional vai se tornando mais alcalino; ou seja, a acidez do meio diminui com o consumo de ácido oleico do meio. Assim, com o passar do tempo, o volume da solução do titulante (NaOH 0,02 M) gasto na dosagem diminui. A Figura 10 mostra a reação de esterificação do ácido oleico.

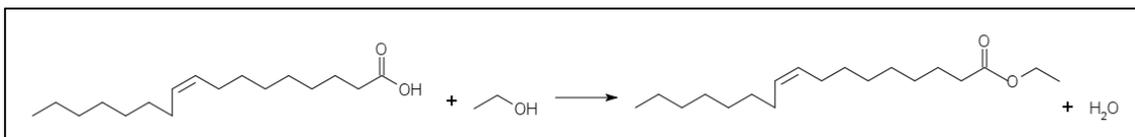


Figura 10: Reação de esterificação do ácido oleico.

Devido à redução do volume de hidróxido de sódio utilizado na titulação, é possível determinar a atividade de esterificação da enzima imobilizada (biocatalisador) (PINTO, 2013). Também é importante lembrar que uma unidade de atividade enzimática (1 UI ou 1 U) corresponde à quantidade de enzima que forma 1  $\mu$ mol de oleato de etila (éster resultante de reação de esterificação do ácido oleico) por minuto nas condições reacionais utilizadas. A equação utilizada para o cálculo da atividade de esterificação dos biocatalisadores é apresentada na Equação 7.

$$A_{\text{esterificação biocat.}} = \frac{(V_{NaOH(0)} - V_{NaOH(t)}) \times [NaOH]_{\text{exp.}} \times V_f \times 1000}{V_{\text{alíquota}} \times t \times m_{\text{biocat.}}} \quad (7)$$

Equação 7: Equação utilizada para o cálculo da atividade de esterificação dos biocatalisadores (PINTO, 2013).

onde,  $A_{\text{esterificação biocat.}}$  é a atividade de esterificação do biocatalisador (UI/g<sub>enzima imobil.</sub>, ou seja, atividade enzimática de 1g de biocatalizador (enzima imobilizada);  $V_{NaOH(0)}$  é o volume de solução de hidróxido de sódio gastos na titulação da alíquota do meio reacional coletada no tempo de 0 minutos (ml);  $V_{NaOH(t)}$  é o volume de solução de hidróxido de sódio gastos na titulação da alíquota do meio reacional coletado no tempo  $t$  (ml);  $[NaOH]_{\text{exp.}}$  é a concentração da solução de hidróxido de sódio após padronização com solução de biftalato de potássio (M);  $V_f$  é o volume final do meio reacional (ml);  $V_{\text{alíquota}}$  é o volume da alíquota retirada do meio reacional e utilizada na titulação (ml);  $t$  é o tempo em que cada alíquota foi retirada do meio reacional (min) e  $m_{\text{biocat.}}$  é a massa do biocatalisador utilizada na reação de esterificação (g).

#### 3.3.2.4. Cinética de Imobilização Baseada na Dosagem de Proteína

A cinética de imobilização baseada na dosagem de proteína presente nas alíquotas dos sobrenadantes colhidos durante a etapa de imobilização enzimática foi avaliada pelo método de Bradford, que utiliza albumina do soro bovino (BSA) como padrão (PINTO, 2013). Os dados foram usados para comparar e confirmar os dados de atividade enzimática obtidos anteriormente.

Primeiramente foi necessário realizar a construção de uma curva padrão de BSA que relaciona soluções de diferentes concentrações com suas respectivas absorvâncias no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm (PINTO, 2013). As concentrações das soluções de BSA utilizadas para construção da curva padrão foram de 1000 ppm, 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm, 200 ppm, 0 ppm. O fator obtido da curva padrão de BSA foi de 0,769 mg/ml \* Abs. Em seguida, 190  $\mu$ L da solução de Bradford e 10  $\mu$ L dos sobrenadantes colhidos durante as imobilizações foram adicionados as depressões de uma placa de Petri de acrílico. Essa placa era levada ao espectrofotômetro, onde as leituras de absorvância eram feitas no mesmo comprimento de onda em que foi realizada a construção da curva padrão ( $\lambda = 595$  nm). A dosagem de proteína foi realizada em triplicata para cada alíquota de sobrenadante colhido durante as imobilizações (PINTO, 2013).

A equação utilizada para calcular a quantidade de proteína presente no sobrenadante é apresentada na Equação 8.

$$P_{(t)} = (Abs_{amostra(t)} - Abs_{branco}) \times f_{BSA} \quad (8)$$

Equação 8: Equação utilizada para cálculo da concentração de proteína presente nos sobrenadantes ao longo da imobilização (PINTO, 2013).

onde  $P_{(t)}$  é a concentração de proteína presente nos sobrenadantes (mg/ml);  $Abs_{amostra(t)}$  é a absorvância da alíquota do sobrenadante colhido durante a imobilização;  $Abs_{branco}$  é a absorvância do branco de referência e  $f_{BSA}$  é o fator obtido da curva padrão de BSA (0,769 mg/ml \* Abs).

Para determinar a quantidade de proteína que ficou retida em cada suporte, foi utilizada a Equação 9.

$$P_{retida\ no\ suporte} = (Abs_{t=0min.} - Abs_{t=25h.}) \times 10 \times f_{BSA} \quad (9)$$

Equação 9: Equação utilizada para calcular a quantidade de proteína retida no suporte ao final de cada imobilização (PINTO, 2013).

Onde  $P_{retida\ no\ suporte}$  é a quantidade de proteína retida no suporte;  $Abs_{t=0min.}$  é a absorvância da alíquota do sobrenadante colhido no início do processo de imobilização (em t= 0 min.);  $Abs_{t=25h.}$  é a absorvância da alíquota do sobrenadante colhido no final do processo de imobilização (em t=25h) e  $f_{BSA}$  é o fator obtido da curva padrão de BSA (0,769 mg/ml\*Abs);

A Equação 9 é multiplicada por um fator de 10 devido ao fato de que foram utilizados 10ml de suspensão enzimática na imobilização de 1 g de cada suporte polimérico produzido (PINTO, 2013).

## 4. Resultados e Discussões

O presente capítulo apresenta os resultados obtidos da caracterização das partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo, com diferentes composições e graus de hidrofobicidade na casca, obtidas por meio da polimerização simultânea em suspensão e emulsão, e que foram utilizadas como suporte para imobilização enzimática da lipase B de *Candida antarctica* (CAL – B). Além disso, este capítulo também avalia o comportamento da atividade enzimática e dos parâmetros de imobilização quando essas partículas poliméricas são utilizadas como suportes para imobilização enzimática.

### 4.1. Polímeros com Morfologia Casca-Núcleo

Para avaliar a influência que a composição da casca dos polímeros casca-núcleo causa na imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CAL – B), foram produzidas partículas poliméricas contendo cascas com diferentes composições e graus de hidrofobicidade, tendo em vista que as lipases mostram-se cataliticamente mais ativas em ambientes hidrofóbicos, por deixarem seus centros catalíticos mais expostos (DELLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Primeiramente, as reatividades e concentração dos comonômeros hidrofóbicos, escolhidos para copolimerizar com o estireno e assim compor a casca, foram avaliados em ensaios de polimerização em massa. Os resultados obtidos estão apresentados no Anexo B. A análise dos resultados permitiu observar que as reações que continham a concentração de 5% em massa do comonômero atingiram sempre conversões altas. Por isso, para sintetizar os suportes casca-núcleo foram utilizadas as composições de 5% em massa do comonômero hidrofóbico na casca. Apesar disso, observa-se em todos os casos a desaceleração da reação na presença do comonômero (com exceção do divinilbenzeno), devido a menor reatividade dos comonômeros.

As partículas casca-núcleo foram obtidas por meio da técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003). As partículas sintetizadas possuem núcleo de PS e casca de: PS; poli(octeno-co-estireno); poli(divinilbenzeno-co-estireno); poli(benzoato de vinila-co-estireno); poli(cardanol-co-estireno). Na Figura 11, são apresentados os núcleos de poliestireno (PS) produzidos por PINTO (2013) na etapa de suspensão.

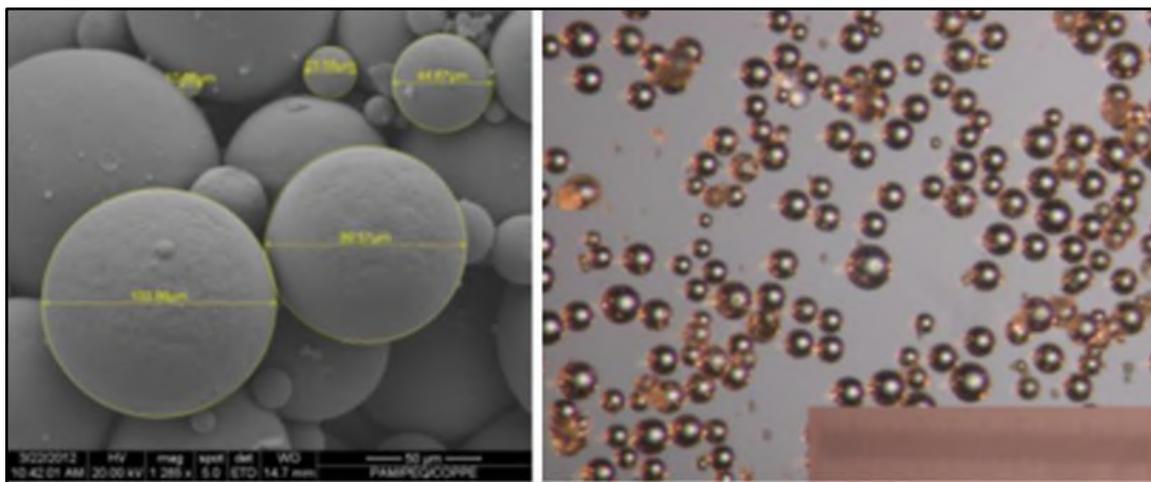


Figura 11: Núcleos de PS produzidos na polimerização em suspensão com duração de 2 horas de reação. A régua possui dimensão de 1000  $\mu\text{m}$  (PINTO, 2013).

A composição do núcleo de PS foi escolhida de acordo com os estudos realizados anteriormente por LENZI *et al.* (2003) por basicamente dois motivos: por ser um material que possui boas propriedades mecânicas e por ser possível alcançar elevados valores de conversão (ou seja, pela reatividade alta do monômero estireno). Na Figura 11, é possível observar que na etapa da polimerização em suspensão são formados núcleos de PS com morfologia completamente esférica.

No que diz respeito à composição da casca, os materiais foram escolhidos de modo a formar uma casca porosa com diferentes hidrofobicidades, tornando possível avaliar o desempenho dos polímeros casca-núcleo obtidos como suportes poliméricos para imobilização enzimática. As cascas foram copolimerizadas com estireno para que os comonômeros selecionados, com diferentes hidrofobicidades (octeno, cardanol, benzoato de vinila e divinilbenzeno), fossem reativos e participassem da polimerização. As micrografias das partículas casca-núcleo sintetizadas estão apresentadas a seguir (Figura 12 a 16).

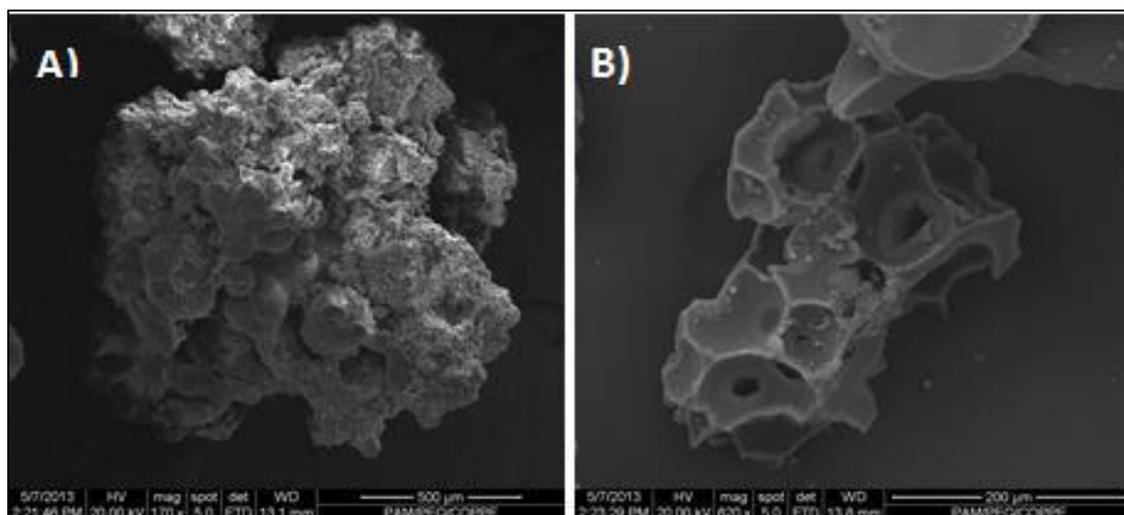


Figura 12: Micrografias eletrônicas por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de PS/PS. A) partícula recoberta; B) casca vazia gerada na emulsão alimentada. Micrografia mostra que o núcleo das partículas casca-núcleo é composto na realidade pela aglomeração de vários núcleos gerados no processo de polimerização em suspensão.

As partículas casca-núcleo de PS/PS foram produzidas para serem utilizadas como um padrão de comparação, com a finalidade de entender como a mudança na composição da casca, através da adição de comonômeros com hidrofobicidades distintas, afeta as características da casca formada e, posteriormente, o processo de imobilização de enzimas. Vê-se claramente na Figura 12 que a partícula formada tem estrutura porosa e é maior que os núcleos originais, por conta do processo de aglomeração controlada das partículas originadas na etapa de reação de polimerização em emulsão.

A análise das micrografias apresentadas nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16 mostra que as partículas casca-núcleo obtidas apresentam uma morfologia floculenta, devido à presença de uma casca porosa formada durante a etapa de emulsão alimentada e ao processo de aglomeração controlada dos núcleos durante a etapa em emulsão. As partículas formadas por poli(cardanol-co-estireno)/PS (Figura 13) apresentaram aparentemente um menor recobrimento; ou seja, as partículas geradas na etapa de emulsão não foram capturadas com eficiência pelo núcleo de PS produzido na etapa de suspensão.

As demais partículas poliméricas apresentaram um recobrimento do núcleo mais uniforme, embora algumas partículas com casca de poli(benzoato de vinila-co-estireno) apresentassem um recobrimento parcial, como é possível observar na Figura 14. Mudanças de eficiência de recobrimento podem ser relacionadas às áreas específicas, como mostrado posteriormente. Do ponto de vista pragmático pode-se considerar que todas as partículas produzidas têm a morfologia desejada.

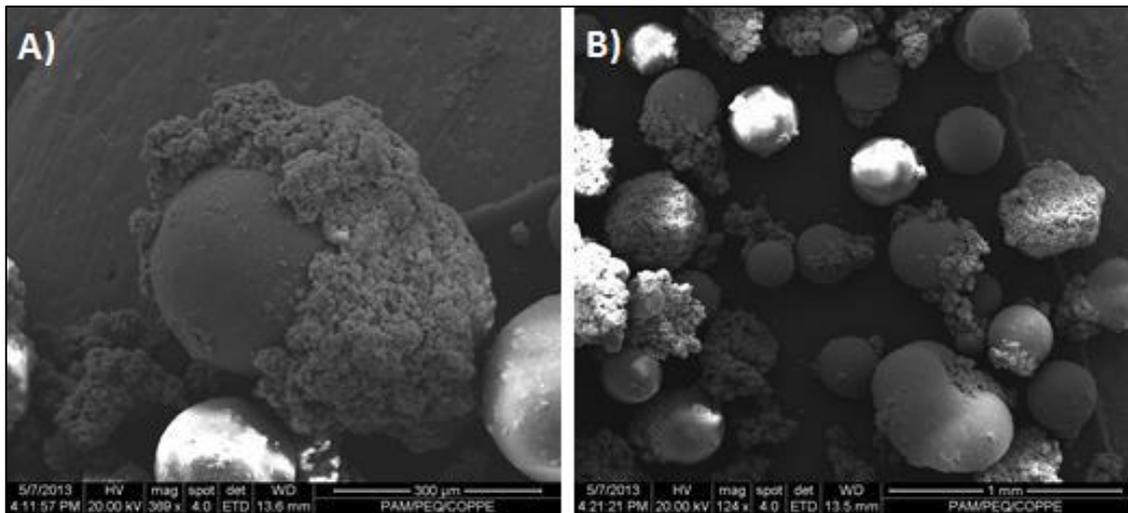


Figura 13: Micrografias eletrônica por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de Poli(cardanol-co-estireno)/Poliestireno. A) partícula parcialmente recoberta; B) Baixa quantidade de partículas recobertas.

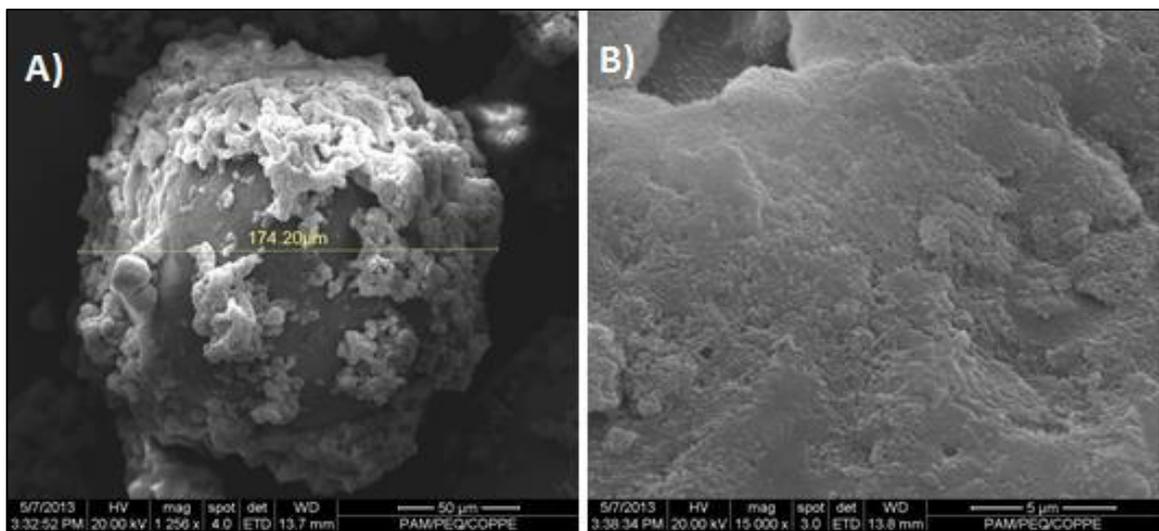


Figura 14: Micrografias eletrônicas por varredura (MEV) e ótica (MO) de partículas casca-núcleo de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/poliestireno. A) partícula parcialmente recoberta; B) Superfície da casca de poli(benzoato de vinila-co-estireno) formada; C) micrografia ótica de partículas casca-núcleo de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/poliestireno, tamanho da régua de 1000μm.

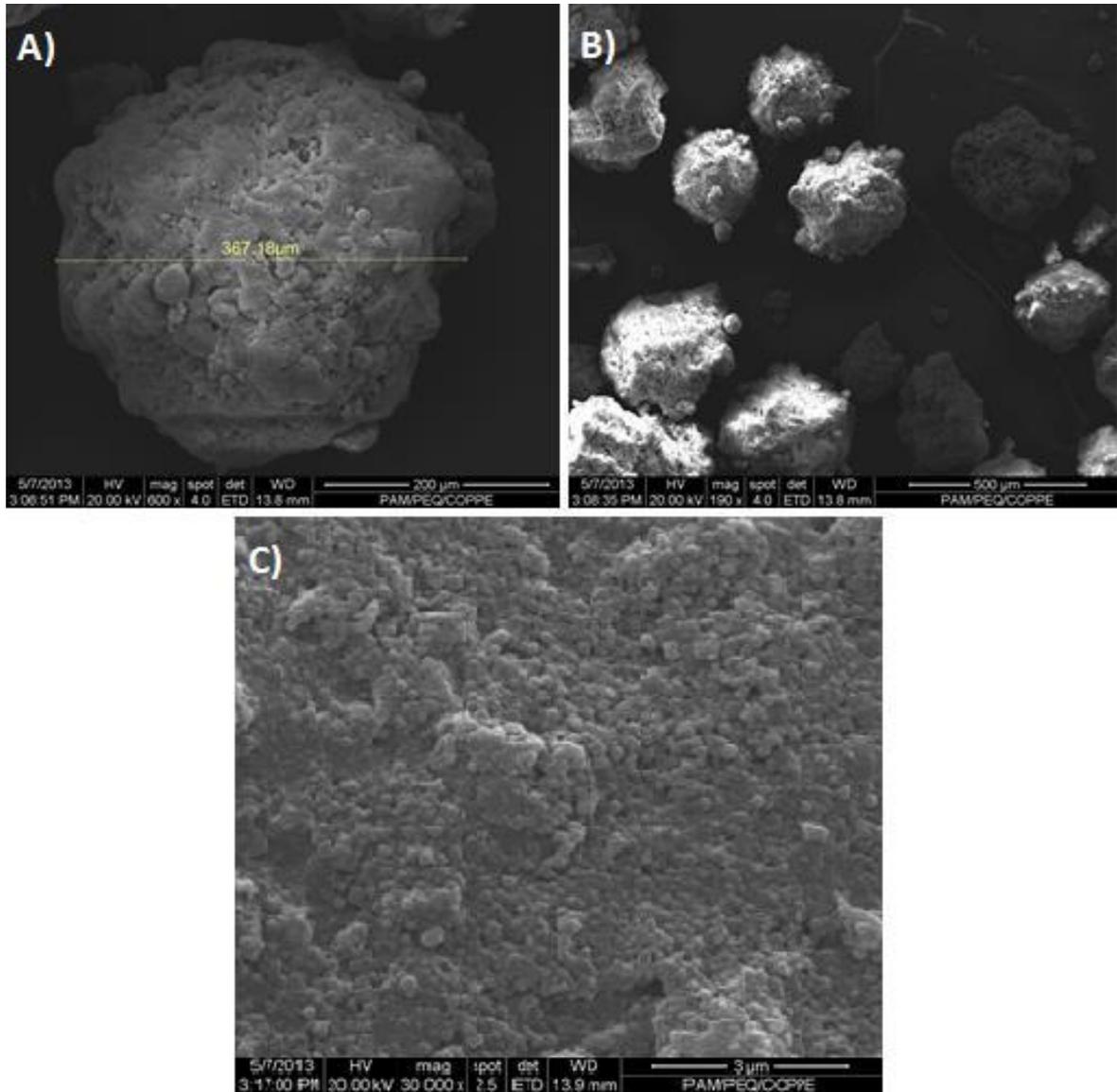


Figura 15: Micrografias eletrônica por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de Poli(octeno-co-estireno)/Poliestireno. A) partícula totalmente recoberta; B) Partículas com recobrimento uniforme; C) superfície das partículas constituídas de nano esferas geradas na etapa de emulsão.

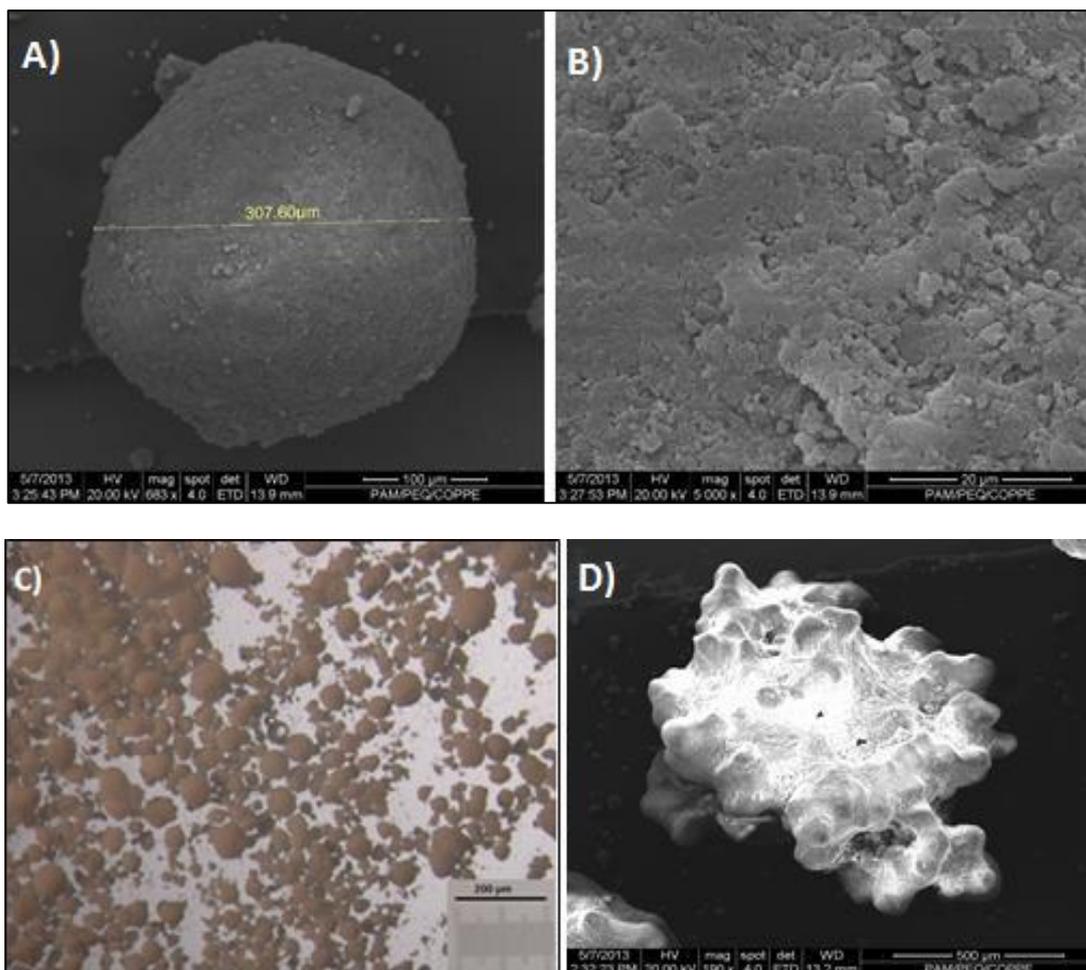


Figura 16: Micrografias eletrônicas por varredura (MEV) de partículas casca-núcleo de Poli(divinilbenzeno-co-estireno)/Poliestireno. A) Partícula totalmente recoberta; B) Superfície da casca da partícula; C) Micrografia ótica das partículas casca-núcleo; D) Partícula contendo múltiplos núcleos, gerados na etapa de polimerização em suspensão, agregados e que estão recobertos pelas partículas da polimerização em emulsão.

Como observado por BESTETI (2009), a duração da etapa de suspensão é um dos parâmetros de maior relevância para a obtenção de uma partícula com uma casca uniforme formada em torno do núcleo. O tempo de 2 horas de reação em suspensão, nas condições definidas no presente trabalho, produz partículas poliméricas esféricas, com caráter pegajoso e viscoso, capazes de capturar com maior eficiência as partículas provenientes da etapa subsequente de emulsão alimentada (BESTETI, 2009). Desse modo, como todas as partículas casca-núcleo sintetizadas no presente trabalho foram obtidas com uma etapa de suspensão com duração de 2 horas para formação dos núcleos de PS, a menor eficiência da formação da casca de poli(cardanol-co-estireno) é devido a maior hidrofilicidade e as menores compatibilidade e reatividade do cardanol na copolimerização, como confirmado adiante.

As curvas de conversão das polimerizações simultâneas em suspensão e emulsão são apresentadas na Figura 17.

Observam-se as menores conversões para os comonômeros cardanol e benzoato de vinila, o que ajuda a explicar as piores eficiências de recobrimento para esses comonômeros.

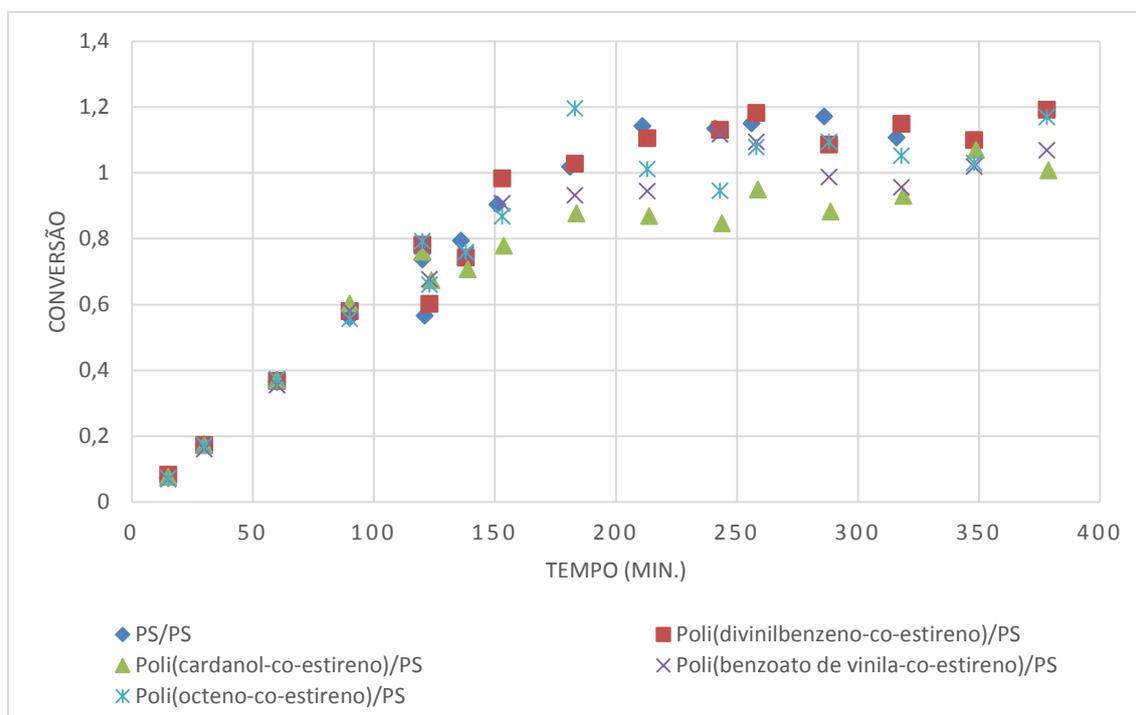


Figura 17: Curvas de conversão das polimerizações simultâneas em suspensão e emulsão de: PS/PS; poli(cardanol-co-estireno)/PS; poli(octeno-co-estireno)/PS; poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS; poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS.

A reação de polimerização realizada na presença de cardanol, ao final de 6 horas de reação resulta nas menores conversões, quando comparadas com as conversões das demais reações, como também observado nas reações em massa do Anexo B. A mais baixa reatividade do comonômero cardanol indica a necessidade de um maior tempo para que as partículas produzidas atinjam conversões comparáveis às das demais reações, ou a utilização de uma maior quantidade de iniciador na condição reacional utilizada. Os demais comonômeros (benzoato de vinila, octeno, divinilbenzeno) mostraram-se mais reativos, não atrapalhando a cinética da polimerização simultânea em suspensão e emulsão (Figura 17). A reação para produção de partículas casca-núcleo de PS/PS e de poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS foram as que apresentaram uma maior conversão, como nas polimerizações em massa. Por introduzir mais grupos vinílicos, as reações com divinilbenzeno são inclusive um pouco mais rápidas.

Para um melhor entendimento das propriedades das partículas formadas no processo de emulsão alimentada, o sobrenadante ao final de cada polimerização simultânea foi analisado. Na Tabela 5 são apresentados os valores de diâmetro médio e teor de sólidos do sobrenadante. As curvas de distribuição de tamanhos de partículas dos sobrenadantes estão apresentadas no Anexo C.

Tabela 5: Valores de diâmetro médio de partícula e teor de sólidos de amostras dos sobrenadantes das reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão.

Partícula casca-núcleo (sobrenadante da reação)		Diâmetro Médio de Partícula do Sobrenadante (nm)	Teor de Sólidos (%)
PS/PS		199,45 ± 0,35	8,6 ± 0,3
Poli(octeno-co-estireno)/PS		372,65 ± 1,63	3,9 ± 0,1
Poli(cardanol-co-estireno)/PS	Fase do topo	478,95 ± 378,66	4,86 ± 0,07
	Fase do meio	3,19 x 10 <sup>4</sup> ± 7488,3	13,17 ± 3,44
Poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS		565,15 ± 26,38	0,5 ± 0,1
Poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS		718,55 ± 119,00	1,0 ± 0,4

Na polimerização com cardanol foi observado a separação do sobrenadante em duas fases. A fase do topo constituída por partículas com diâmetro médio de 478,95 ± 378,66 nm e a fase do meio por partículas com diâmetro médio 3,19 x 10<sup>4</sup> ± 7488,3 nm. A fase do topo apresenta um menor teor de partículas comparado a fase do meio.

Os valores de diâmetro médio das partículas presentes nos sobrenadantes das reações são típicos de partículas originadas de polimerização em emulsão, pois encontram-se na faixa de 100-3000nm (ODIAN, 2004), exceto o valor de 3,19 x 10<sup>4</sup> ± 7488,3 nm referente ao diâmetro médio de partícula do sobrenadante da reação de produção de partículas de poli(cardanol-co-estireno)/PS. Esse valor é típico de partículas provenientes de polimerizações em suspensão (50-500µm (ODIAN, 2004); logo, pode ser devido a presença de resíduo de polímero (núcleo de PS com baixíssimo recobrimento) presente na alíquota do sobrenadante colhida para análise. O cardanol possui propriedades surfactantes e pode estabilizar partículas maiores, o que é corroborado pelos altos conteúdos de sólidos dos sobrenadantes obtidos na reação com cardanol.

Os teores de sólidos presentes no sobrenadante indicam a eficiência de formação da casca e a compatibilidade e reatividade do núcleo com a composição das partículas originárias do processo de emulsão, além da capacidade de captura dessas partículas pelo núcleo. Esse resultado confirma a observação visual de que as partículas que possuem menores recobrimentos são as que contêm casca de poli(cardanol-co-estireno) (4,86 ± 0,07 % (fase do topo) e 13,17 ± 3,44 % (fase do meio)). Para as demais reações de copolimerização, o recobrimento obtido parece ser satisfatório, com base no teor de sólidos no sobrenadante. Portanto, parece ser possível afirmar que as partículas são compatíveis com o núcleo,

ocorrendo a captura e copolimerização dessas com as partículas do núcleo, formando uma casca mais uniforme. A casca só permanece formada sobre o núcleo se houver uma interação entre o material da partícula da emulsão e o material da partícula do núcleo (copolimerização). Foi possível também perceber que os polímeros casca-núcleo formados com os monômeros divinilbenzeno, 1-octeno e benzoato de vinila apresentaram baixos teores de sólidos no sobrenadante e maiores diâmetros médios de partículas produzidas no processo de emulsão, quando comparados com o polímero casca-núcleo de PS, indicando provavelmente a menor afinidade com o meio aquoso. É importante observar que as mudanças de tamanhos das partículas presentes no sobrenadante sugere a variação dos diâmetros de poros, já que a casca é formada pela aglomeração das partículas produzidas na emulsão.

As distribuições de massas molares dos materiais produzidos estão ilustradas na Figura 18. Os valores dos índices de polidispersão (IP) e das massas molares ponderais médias ( $M_w$ ) são apresentados na Tabela 6.

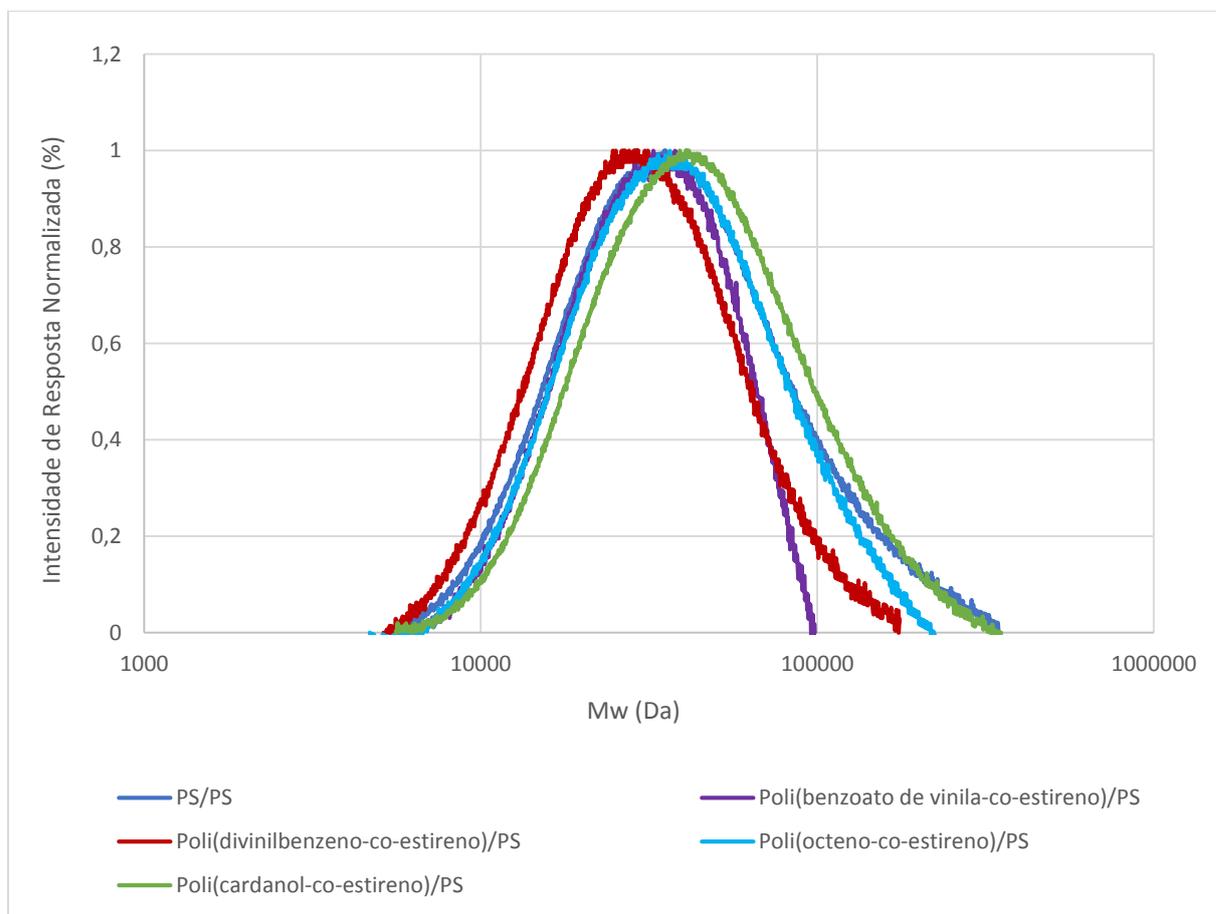


Figura 18: Distribuições de massas molares das partículas casca-núcleo.

Tabela 6: Valores de massa molar ponderal média (Mw), índice de polidispersão (IP) e temperatura de transição vítrea (Tg) das partículas casca-núcleo sintetizadas. Parâmetros obtidos através da análise de GPC (Mw e IP) e DSC (Tg).

<b>Partícula Casca-Núcleo</b>	<b>Mw (Da)</b>	<b>IP (Mw/Mn)</b>	<b>Tg (°C)</b>
Poli(cardanol-co-estireno) / PS	49.415	1,58	101,01
PS / PS	44.646	1,66	99,77
Poli(octeno-co-estireno) / PS	41.636	1,50	98,91
Poli(divinilbenzeno-co-estireno) / PS	32.784	1,45	-----
Poli(benzoato de vinila-co-estireno) / PS	32.627	1,30	94,08

Para todas as partículas casca-núcleo obtidas, a distribuição de massas molares é unimodal, característica de polymerizações de estireno em suspensão. As massas molares ponderais médias (Mw) e os índices de polidispersão são relativamente baixos, característicos das polymerizações de estireno em suspensão, não caracterizando a combinação dos dois processos de polymerização em suspensão e emulsão. Os valores de Mw característicos de uma polymerização em suspensão estão em torno de  $30 \times 10^3$  Da (ODIAN, 2004). Isso mostra a forte interação química existente entre as fases núcleo e casca formadas ao longo do processo, como discutido por BESTETI (2009).

Na Figura 18 é possível observar um deslocamento das curvas, referente às partículas com casca de poli(divinilbenzeno-co-estireno) e poli(benzoato de vinila-co-estireno), para menores valores de massa molar. No caso das partículas com divinilbenzeno (DVB), esse desvio pode não ser representativo, pois o DVB causa reticulação, de maneira que parte do polímero é insolúvel. Por isso, é importante salientar que o valor de Mw para as partículas com casca de poli(divinilbenzeno-co-estireno) corresponde à fração que foi solúvel no solvente THF, que é a fase móvel utilizada nas análises de GPC. O aumento de massa molar no caso das partículas contendo cardanol provavelmente reflete o maior tempo da reação em emulsão, dado o maior teor de sólidos no sobrenadante. Nos outros casos, as menores massas molares refletem a menor reatividade do comonômero.

Em relação aos valores de temperatura de transição vítrea (Tg) dos polímeros obtidos, é possível perceber que, quando comparado com o valor de Tg das partículas casca-núcleo de PS (99,77°C), há uma diminuição nos valores de Tg referentes aos polímeros casca-núcleo de poli(octeno-co-estireno)/PS e de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS (98,91°C e 94,08°C respectivamente). Esse deslocamento da Tg para menores valores é um indicativo de que ocorreu uma copolimerização entre o monômero

estireno e os comonômeros benzoato de vinila e 1-octeno. Logo, pode-se dizer que foi possível obter materiais com diferentes composições da casca.

A Figura 19 mostra também que existe uma correlação forte entre a Tg e o Mw das amostras avaliadas.

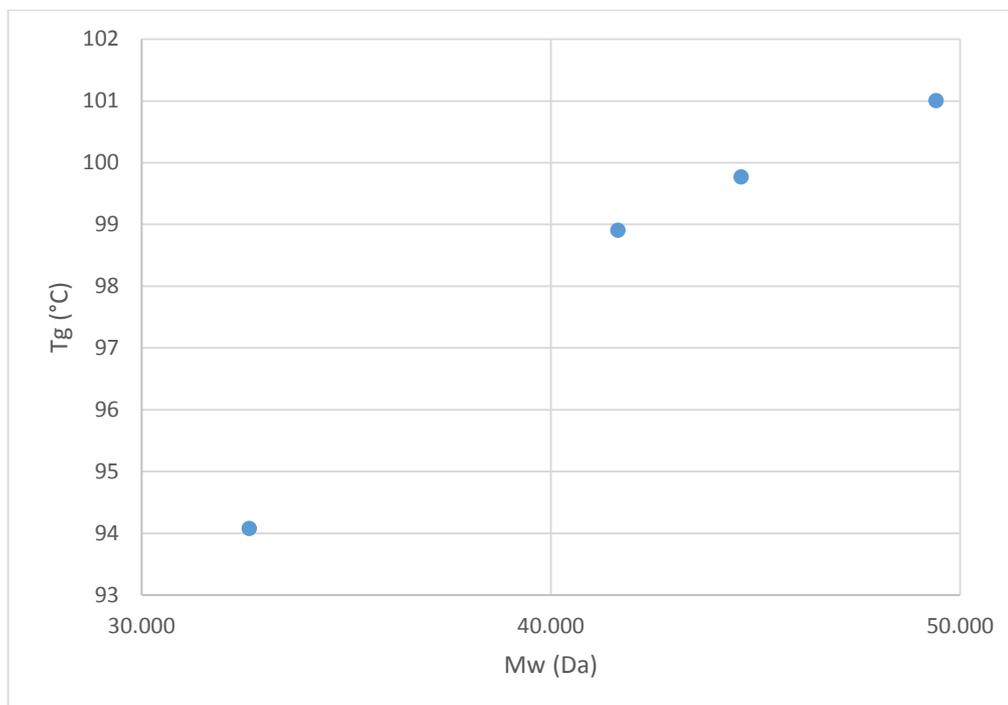


Figura 19: Relação entre temperatura de transição vítrea (Tg) e massa molar ponderal média (Mw) das partículas casca-núcleo.

A transição vítrea não foi observada na amostra que contém casca de poli(divinilbenzeno-co-estireno), o que indica que o polímero está muito reticulado. No polímero com casca de poli(cardanol-co-estireno) não houve uma mudança significativa no valor da Tg (99,77°C), quando comparado ao polímero casca-núcleo de PS (101,01°C), o que indica um teor de casca formada muito baixo, como foi constatado anteriormente nas análises de teor de sólidos do sobrenadante e nas micrografias.

Na Tabela 7, são apresentados os valores de diâmetro médio das partículas casca-núcleo preparadas e na Figura 20 são apresentadas as distribuições de tamanhos dessas partículas.

Tabela 7: Valores de diâmetro médio de partículas casca-núcleo obtidos através da análise de distribuição de tamanhos de partículas.

<b>Partículas Casca-Núcleo</b>	<b>Diâmetro médio de partículas (µm)</b>
PS / PS	821,4 ± 100,2
Poli(divinilbenzeno-co-estireno) / PS	381,3 ± 182,9
Poli(cardanol-co-estireno) / PS	200,4 ± 10,4
Poli(benzoato de vinila-co-estireno) / PS	137,5 ± 12,7
Poli(octeno-co-estireno) / PS	130,7 ± 8,1

As partículas de PS/PS apresentaram diâmetro médio de  $821,4 \pm 100,2 \mu\text{m}$ , enquanto as partículas de poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS apresentaram diâmetro médio de  $381,3 \pm 182,9 \mu\text{m}$ . Esses altos valores são característicos da aglomeração controlada das partículas durante a polimerização em emulsão, indicando uma combinação entre os processos de polimerização em suspensão e emulsão. Quando comparados com os diâmetros médios das demais partículas, os altos valores de diâmetro indicam um alto grau de agregação das partículas, o que pode ser observado nas micrografias das Figuras 12 e 16, e que as reações de polimerização simultânea que as originam, fornecem partículas com uma grande dispersão de tamanhos (como indicado pelo alto valor de desvio padrão, iguais a 100,2 e 182,9  $\mu\text{m}$ , respectivamente). Essa agregação de partículas é causada provavelmente pela aglomeração de núcleos de poliestireno produzidos na polimerização em suspensão, e que são posteriormente recobertos pelas partículas geradas no processo de polimerização em emulsão, resultando assim, em partículas com diâmetros grandes. A natureza da casca afeta o processo de aglomeração, o que constitui uma ferramenta interessante para controle das propriedades morfológicas finais das partículas.

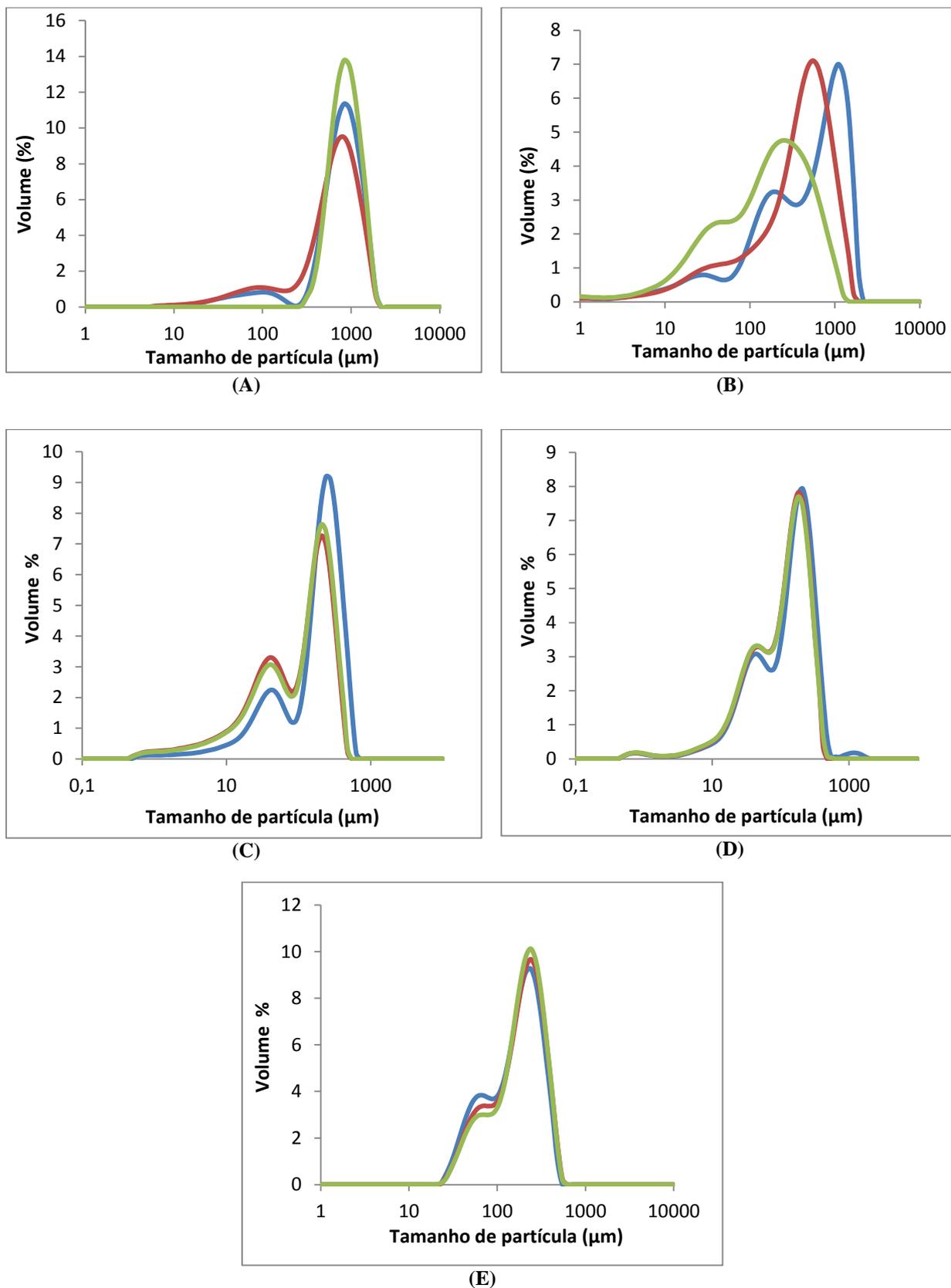


Figura 20: Distribuições de tamanhos das partículas casca-núcleo: (A) PS/PS; (B) poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS; (C) poli(octeno-co-estireno)/PS; (D) poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS e (E) poli(cardanol-co-estireno)/PS.

A análise de área específica e diâmetro médio de poro apresentados na Tabela 8, mostrou que de fato ocorreu a formação de uma casca porosa em volta do núcleo, com diferentes graus de recobrimento, e que a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos componentes que formam a casca influenciam na obtenção de uma casca porosa. Como constatado por BESTETI (2009), forma-se uma casca porosa quando a  $T_g$  do material que compõe a casca e que se deseja copolimerizar com o núcleo possui um valor maior que a temperatura do meio reacional (no caso considerado, 85 °C).

Tabela 8: Resultados de área específica, diâmetro médio de poro e volume de poro, das partículas casca-núcleo.

<b>Partícula Casca-Núcleo</b>	<b>Área específica (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Diâmetro Médio de Poro (Å)</b>	<b>Volume de Poro (cm<sup>3</sup>/g)</b>
Poli(divinilbenzeno-co-estireno) / PS	18,3	217,8	0,112
Poli(octeno-co-estireno) / PS	5,6	292,6	0,040
Poli(cardanol-co-estireno) / PS	3,2	264,8	0,023
PS / PS	1,6	357,5	0,013
Poli(benzoato de vinila-co-estireno) / PS	1,2	378,0	0,019

A área específica e o diâmetro médio de poro também mostram uma certa relação com o teor de sólidos presentes nos sobrenadantes ao final das polymerizações simultâneas. A partícula casca-núcleo possui uma maior área específica quando as partículas produzidas no processo de polymerização em emulsão são capturadas e apresentam maior compatibilidade com o material que constitui o núcleo, resultando em um menor teor de sólidos presentes no sobrenadante. A área específica corresponde a área da partícula como um todo, ou seja, leva em consideração o núcleo e a casca porosa (BESTETI, 2009).

É possível também notar que existe uma relação inversa entre a área específica e o diâmetro médio de poro (Figura 21). O aumento da área específica de uma partícula casca-núcleo resulta na diminuição no diâmetro médio dos poros devido à nucleação e compactação das partículas geradas na fase da polymerização em emulsão sobre os núcleos gerados na fase da polymerização em suspensão. É possível também perceber a existência de uma relação entre a dimensão das partículas gerada durante a polymerização em emulsão (diâmetro médio de partícula do sobrenadante) e diâmetro médio de poro,

como mostrado na Figura 22, confirmando a idéia de que as partículas se agregam umas sobre as outras (BESTETI, 2009), além da aglomeração das partículas há também o efeitos de contração do volume a medida que o polímero é formado (PINTO, 2013).

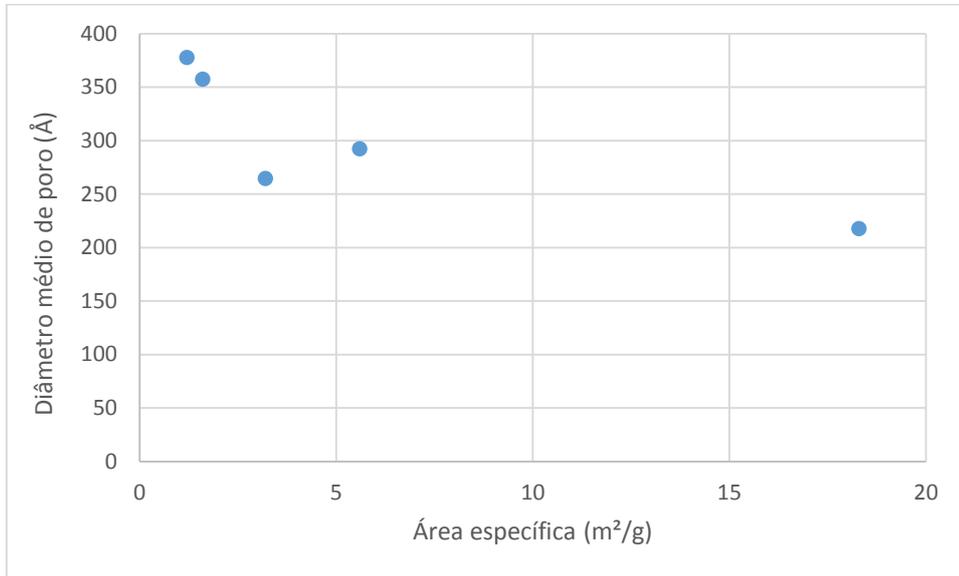


Figura 21: Relação entre diâmetro médio de poro e área superficial das partículas casca-núcleo.

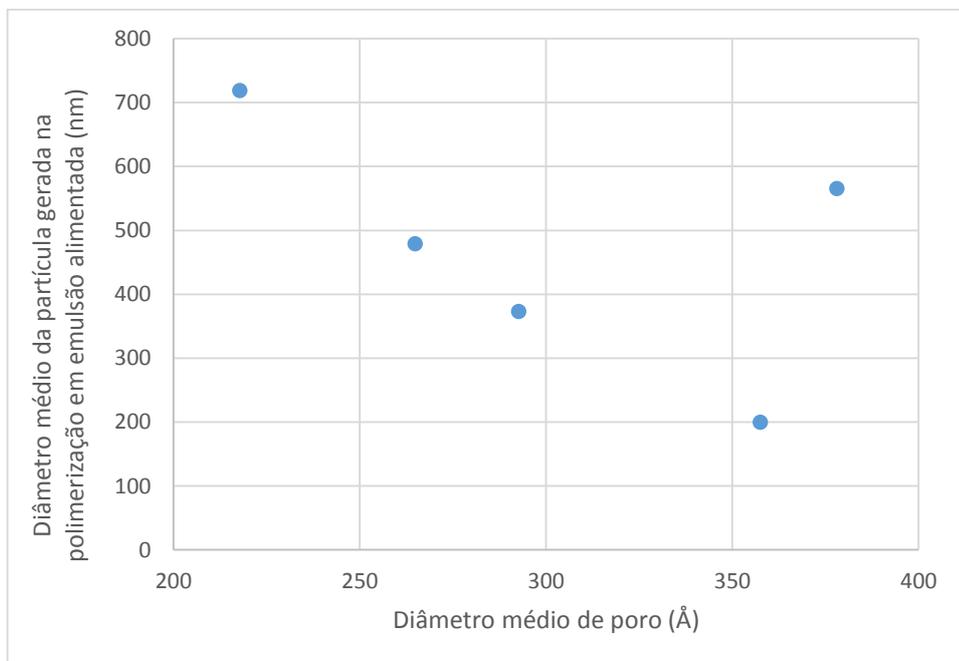


Figura 22: Relação entre diâmetro das partículas geradas pela polimerização em emulsão e diâmetro médio de poros das partículas casca-núcleo.

Além da área específica das partículas casca-núcleo estar relacionada ao diâmetro médio das partículas geradas na emulsão, é também possível notar uma relação com o volume de poros como mostrado na Figura 23, corroborando a teoria de que o aumento da área específica das partículas ocorre principalmente em função da quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo e não à morfologia dessas partículas (PINTO, 2013).

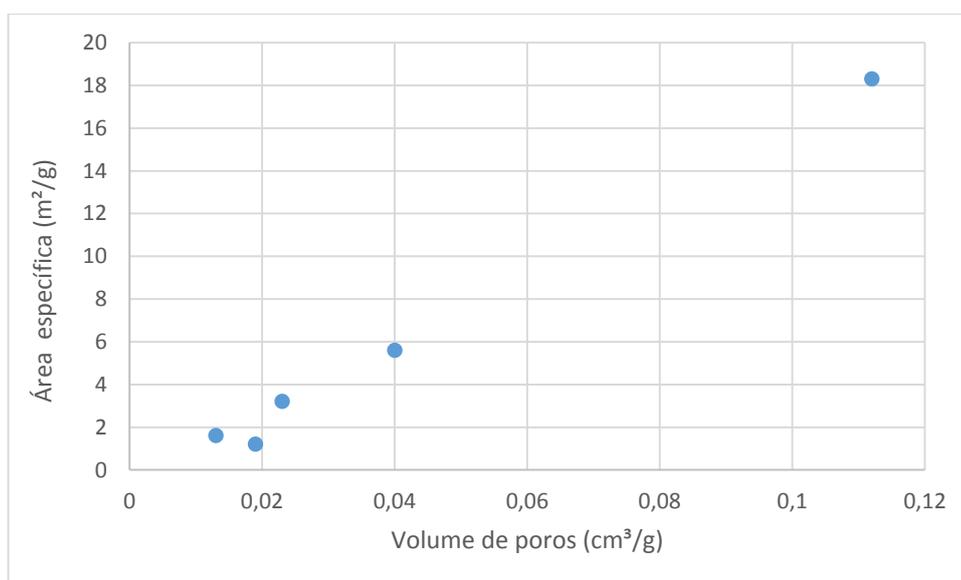


Figura 23: Relação entre área específica e volume de poros das partículas casca-núcleo.

Como o objetivo era produzir partículas com morfologia casca-núcleo contendo casca com diferentes composições e graus de hidrofobicidade, foi então avaliado quão hidrofóbicas eram as composições da casca. Para tal, foi medido o ângulo de contato das partículas em relação à água (solvente polar). Na Tabela 9 são apresentados os valores de ângulo de contato para cada partícula em relação à água.

Tabela 9: Valores de ângulo de contato das partículas com diferentes composições na casca em relação a água.

<b>Partícula Casca-Núcleo</b>	<b>Ângulo de Contato (<math>\theta</math>)</b>
Poli(divinilbenzeno-co-estireno) / PS	$84,0 \pm 1,7^\circ$
Poli(octeno-co-estireno) / PS	$71,9 \pm 0,9^\circ$
Poli(cardanol-co-estireno) / PS	$78,4 \pm 1,7^\circ$
PS / PS	$91,8 \pm 0,7^\circ$
Poli(benzoato de vinila-co-estireno) / PS	$71,3 \pm 2,3^\circ$

De acordo com a técnica utilizada na análise, a única amostra que apresentou uma composição hidrofóbica ( $\theta > 90^\circ$ ) foi o polímero casca- núcleo de PS/PS, apresentando ângulo de contato igual a  $91,8 \pm 0,7^\circ$ . As demais amostras apresentaram um certo caráter hidrofílico, pois os valores do ângulo de contato para essas partículas foi menor que  $90^\circ$  ( $\theta < 90^\circ$ ).

A estrutura da composição da casca justifica alguns dos resultados de ângulo de contato encontrados. Das amostras analisadas, o polímero com casca de poli(benzoato de vinila-co-estireno) é o que possui o caráter mais hidrofílico (polar,  $\theta = 71,3 \pm 2,3^\circ$ ), fato que pode ser explicado pela presença de um grupamento éster ligado a um radical benzila, que permite a deslocalização de carga estabilizada por ressonância entre o anel benzênico e a carbonila do éster. A presença de um grupamento fenólico nas partículas com casca de poli(cardanol-co-estireno) diminui a hidrofobicidade da partícula, devido à deslocalização da carga estabilizada por ressonância no anel benzênico. A amostra que contém casca de poli(octeno-co-estireno) apresentou o caráter muito hidrofílico ( $71,9 \pm 0,9^\circ$ ), contrapondo-se às expectativas. Era esperado um caráter hidrofóbico devido à presença de uma longa cadeia hidrocarbônica apolar proveniente do comonômero 1-octeno. Um possível motivo para não observar um ângulo de contato alto foi a técnica utilizada para caracterizar as partículas. A metodologia consistia na medida do ângulo de contato de uma pastilha feita da amostra; ou seja, a amostra era prensada por uma prensa hidráulica. Porém, ao fazer a pastilha, a estrutura da amostra floculenta e porosa pode ser destruída. Assim, a metodologia utilizada pode não permitir a avaliação correta da hidrofobicidade dessas amostras, pois a estrutura delas é modificada para determinação do ângulo de contato. Desse modo, para obter melhores resultados acerca da hidrofobicidade das partículas casca-núcleo, pode ser necessário utilizar uma metodologia que não altere a estrutura morfológica das partículas. As estruturas moleculares dos copolímeros formados nas casca estão apresentados na Figura 24.

A despeito do que foi discutido na último parágrafo, é possível que as medidas de hidrofobicidade sejam muito afetadas pela presença de emulsificante (surfactante). Isso pode explicar o fato da maior parte das amostras ser hidrofílica, mesmo nos casos em que não parece haver justificativa para isso. Sabe-se que esse aspecto da polimerização em emulsão é crítico, sendo muito difícil remover emulsificante de amostras de polímero. Isso deve ser mais bem investigado no futuro.

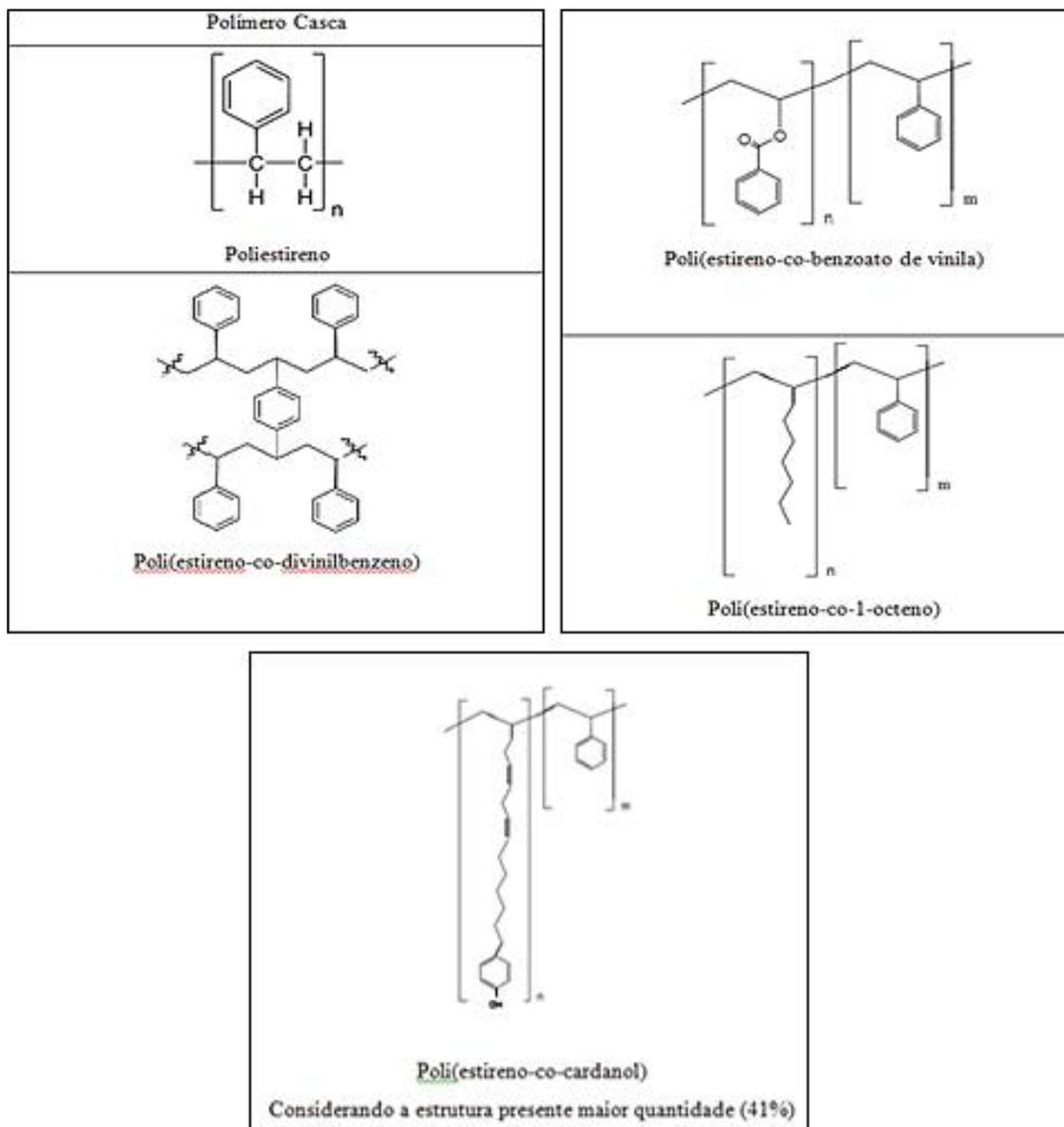


Figura 24: Estrutura dos copolímeros presentes nas cascas das partículas com núcleo de poliestireno (PS).

As partículas também foram caracterizadas quanto à composição utilizando a técnica de FTIR. Porém, como essa espectroscopia é uma técnica de baixa sensibilidade, não foi possível observar as alterações de composição da casca. As mudanças na composição da casca é devido, em parte, às baixas concentrações de monômero em relação à massa de polímero, iguais a cerca de 1-5% em massa no caso de conversão completa. Como a conversão não é completa e como os comonômeros são menos reativos que o estireno, a composição deve ser ainda menor requerendo assim a utilização de técnicas mais sensíveis para caracterização da composição das partículas, como é o caso da técnica de RMN. Os espectros de FTIR estão apresentados no Anexo D.

Embora não tenha sido possível determinar a composição das partículas poliméricas pela técnica utilizada, pode-se afirmar que foram produzidas partículas poliméricas com diferentes composições na

casca porque foi possível observar alterações de propriedades pelas técnicas que foram utilizadas para caracterização dos suportes, como área específica, MEV, GPC, DTP e ângulo de contato. Além disso, os dados de imobilização da enzima mostrados nas próximas seções mostram que cada tipo de partícula interage de maneira diferente com a enzima.

## 4.2. Imobilização Enzimática

Após a síntese e caracterização das partículas casca-núcleo, estas foram utilizadas como suportes para a imobilização da lipase B de *Candida antártica*. Após a imobilização, a atividade da enzima imobilizada foi avaliada quanto à eficiência para catalisar reações de hidrólise e de esterificação. A enzima (CAL – B) foi imobilizada nos suportes casca-núcleo utilizando o método de imobilização por adsorção física, que explora os efeitos de interações hidrofóbicas entre o suporte casca-núcleo, com composições de casca com diferentes graus de hidrofobicidade, e a enzima, como já relatado.

A cinética do processo de imobilização foi acompanhada por meio da dosagem da atividade de hidrólise da enzima, em sua forma solúvel, presente no sobrenadante e ao longo da imobilização. Os perfis cinéticos dos processos de imobilização estão apresentados nas Figuras 25 e 26.

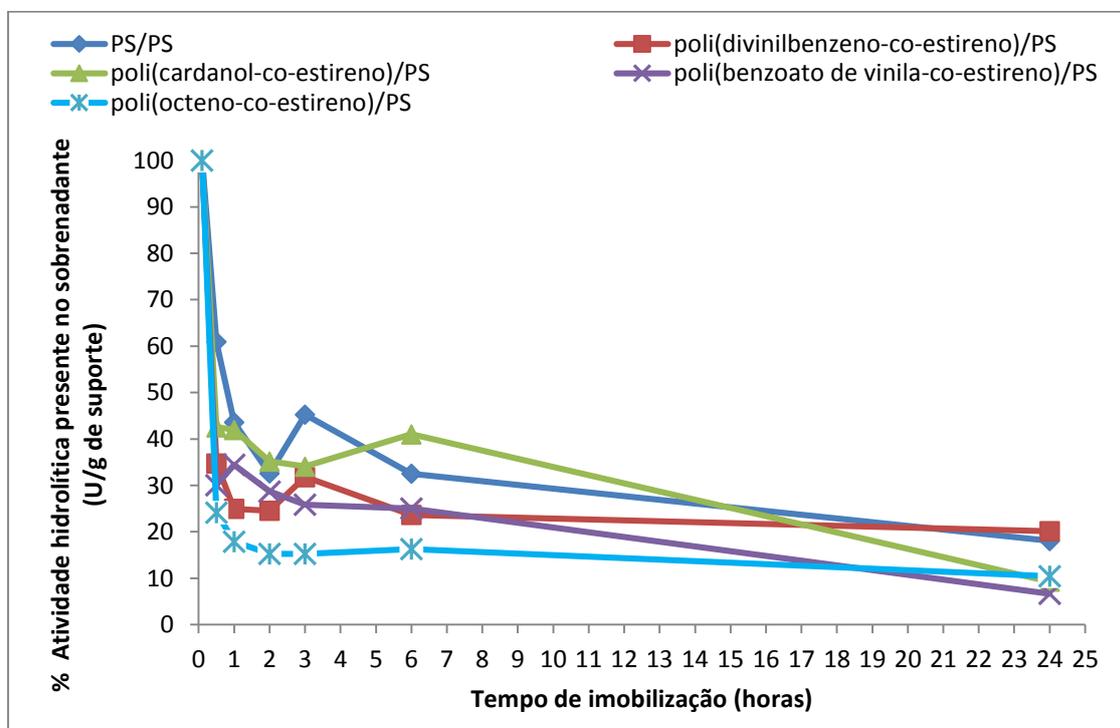


Figura 25: Perfil cinético da imobilização da CAL-B nos suportes casca-núcleo. Cinética acompanhada pela medida da atividade de hidrólise da enzima presente em sua forma solúvel no sobrenadante ao longo do processo de imobilização.

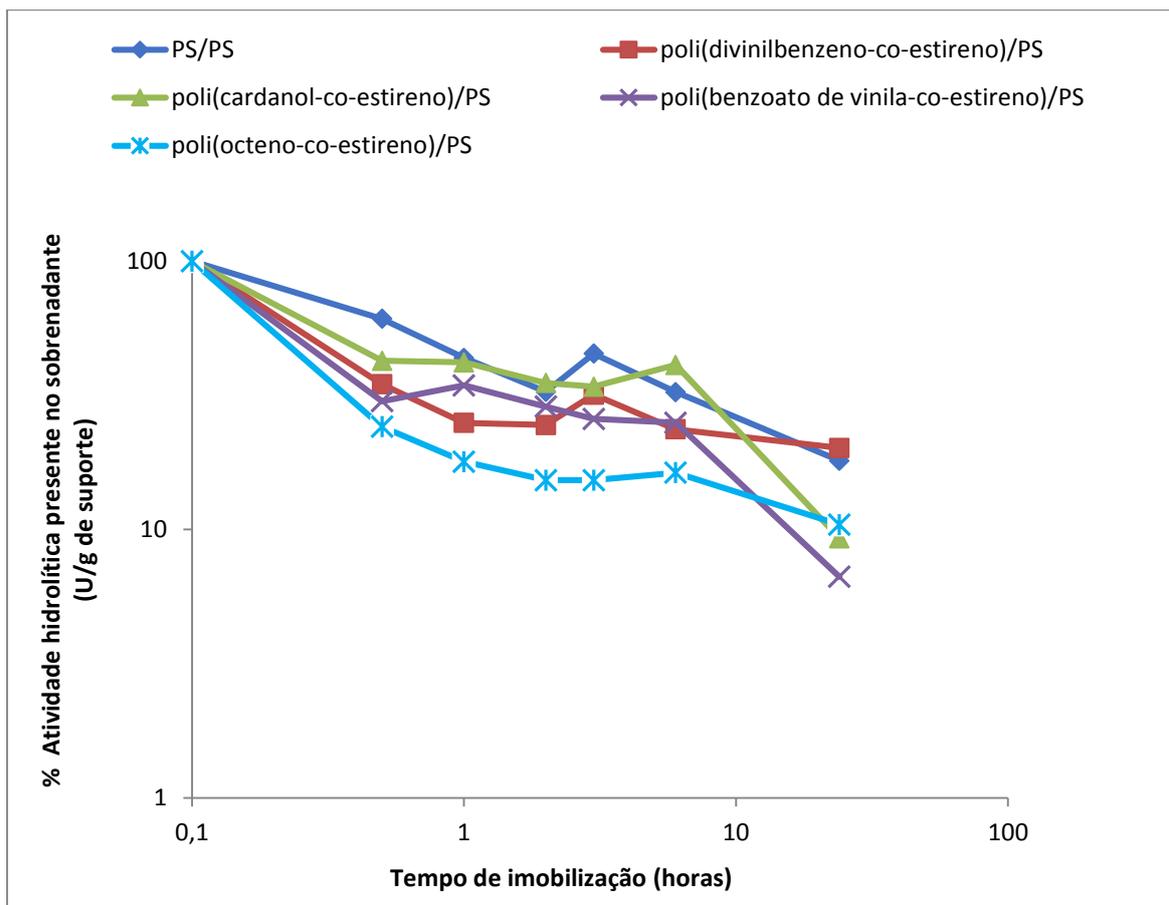


Figura 26: Gráfico, Log Log da cinética do processo de imobilização baseada na atividade de hidrólise da enzima solúvel presente no sobrenadante ao longo da imobilização.

As curvas cinéticas do processo de imobilização apresentadas nas Figuras 25 e 26 são similares, apenas mudou-se a escala para permitir a melhor análise dos dados. Pela análise das curvas cinéticas, observa-se que o suporte casca-núcleo de poli(octeno-co-estireno)/PS resultou em maior velocidade de adsorção da enzima nos instantes iniciais de imobilização. Já o suporte de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS foi o que apresentou o maior eficiência de imobilização, seguido dos suportes poli(cardanol-co-estireno)/PS e poli(octeno-co-estireno)/PS, como indicado na Figura 27. Isso mostra que a existência de grupos pendentes nas cadeias de poliestireno permitem o aumento da eficiência de adsorção, a despeito das maiores áreas específicas dos copolímeros que contêm divinilbenzeno (DVB). Os resultados foram ainda melhores no caso da existência de grupos pendentes polares, dada a natureza hidrofílica da CAL- B.

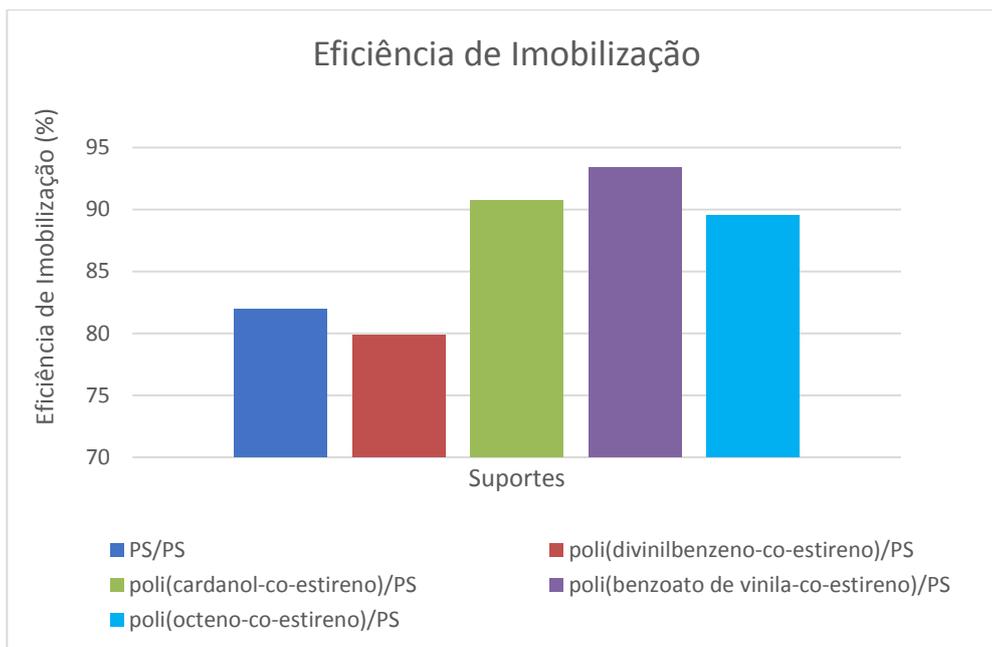


Figura 27: Eficiência de imobilização dos suportes casca-núcleo com diferentes composições de casca.

Também foi possível acompanhar a variação da concentração de proteína presente no meio ao longo das imobilizações. Na Figura 28, são apresentados os resultados da dosagem de proteína realizada ao longo do processo de imobilização. No Anexo E, é apresentada a curva padrão de BSA utilizada para a determinação da concentração de proteína presente no meio.

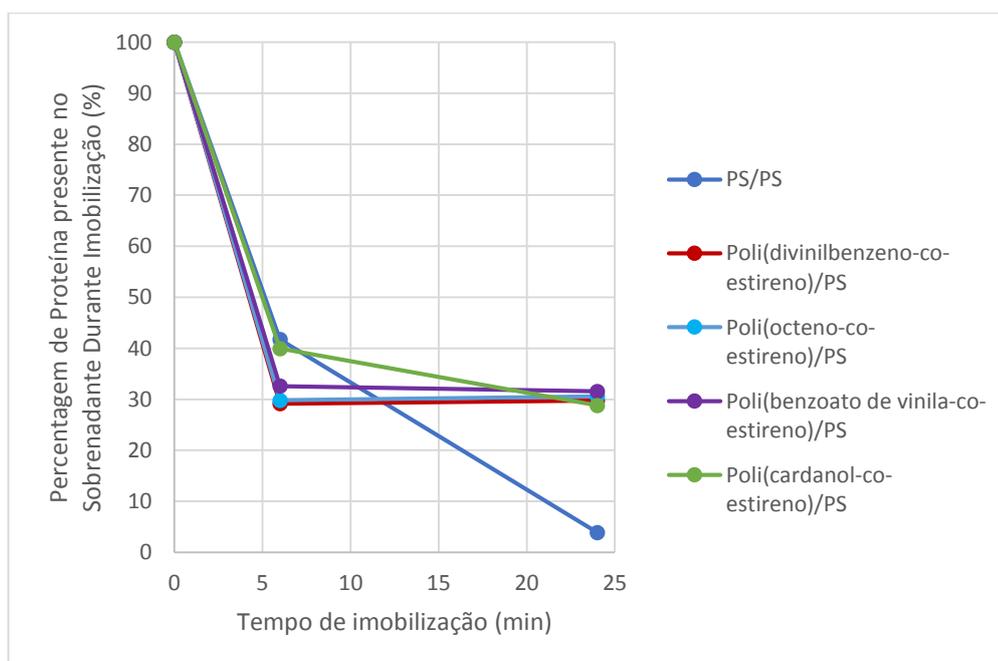


Figura 28: Perfil cinético de imobilização baseado na quantidade de proteína presente no meio, ao longo da imobilização.

Observa-se em todos os casos que aproximadamente 60-70% da proteína (enzima) foram adsorvidas nas primeiras horas do processo de imobilização nos suportes casca-núcleo. Um valor discrepante para suportes de PS/PS também pode ser observado na Figura 28. Os valores obtidos para a dosagem de proteína não são compatíveis com os perfis cinéticos do processo de imobilização baseados na atividade de hidrólise do sobrenadante, como pode ser visto nas Figuras 25 e 26. Tendo em vista esses fatores, a dosagem de proteína no sobrenadante do processo de imobilização com suporte de PS/PS deve ser novamente analisado. Apesar disso, a análise de dosagem de proteína mostra que a atividade da enzima diminuiu, não por causa de desnaturação, mas por causa da incorporação nos suportes. Como a enzima foi imobilizada a 30 °C, admite-se que a perda de atividade foi mínima devido a preservação de sua estrutura quaternária.

Segundo MOJOVIC *et al.* (1998), as lipases podem ser consideradas esferas com diâmetro na faixa de 50 a 70 Å. Assim, para que partículas poliméricas sejam utilizadas como suportes de enzima, um dos muitos requisitos é que os diâmetros dos poros devem possuir dimensões um pouco superiores às dimensões características das enzimas. Na imobilização da enzima em suportes que possuem poros com diâmetros pequenos, pode ocorrer a deformação da enzima adsorvida e também podem ocorrer problemas de transferência de massa, ou seja, dificuldade de difusão de substratos da reação e de produtos devido aos poros estreitos do suporte. Em contrapartida, poros muito grandes favorecem a dessorção da enzima imobilizada (BESTETI, 2011). Em todos os suportes analisados, os poros são grandes o suficiente para conterem as enzimas.

A eficiência de imobilização está atrelada às características morfológicas e moleculares dos suportes em que a enzima foi imobilizada. Como os suportes possuem diferentes composições na casca, possuem também diferentes graus de hidrofobicidade (polaridade), áreas específicas e diâmetros médios de poro. Tendo em vista esse fato, essas características dos suportes foram avaliadas quanto à influência na eficiência de imobilização.

Nas Figuras 29, 30, 31 e 32 estão apresentadas as influências que algumas propriedades dos suportes causam no comportamento da eficiência de imobilização.

É possível perceber a existência de uma relação entre a polaridade da casca do suporte e a eficiência de imobilização, assim como em relação à área específica. Nessas relações é possível perceber uma tendência para aumento da eficiência de imobilização quando se utilizam suportes com um caráter mais hidrofílico (polar) (Figura 29). Esse fato pode ser explicado pelo fato do ambiente em que são realizadas as imobilizações ser polar (meio aquoso), pois nesses suportes a solução enzimática (que está em meio aquoso) consegue penetrar os poros com mais facilidade. É possível também perceber que a eficiência de imobilização, além de ser influenciada pela hidrofobicidade dos suportes, também pode sofrer a influência das áreas específicas (Figura 30) e dos diâmetros médios de poro (Figura 31), embora a correlação parece mais forte com a hidrofobicidade.

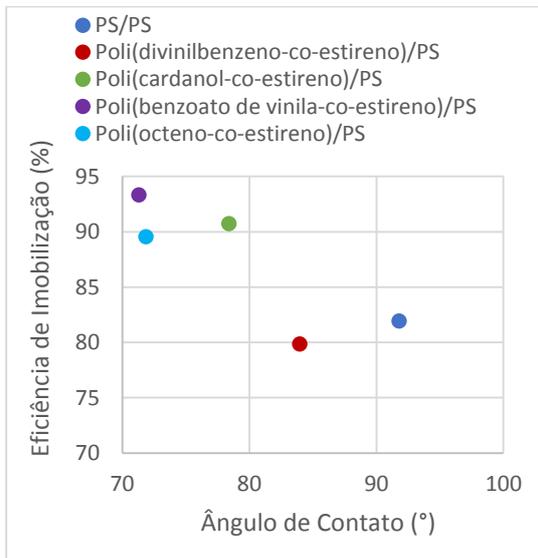


Figura 29: Relação entre eficiência de imobilização e grau de hidrofobicidade.

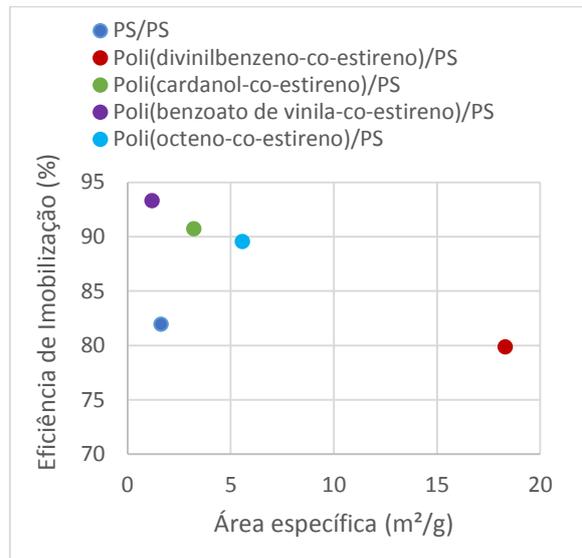


Figura 30: Relação entre eficiência de imobilização e área específica.

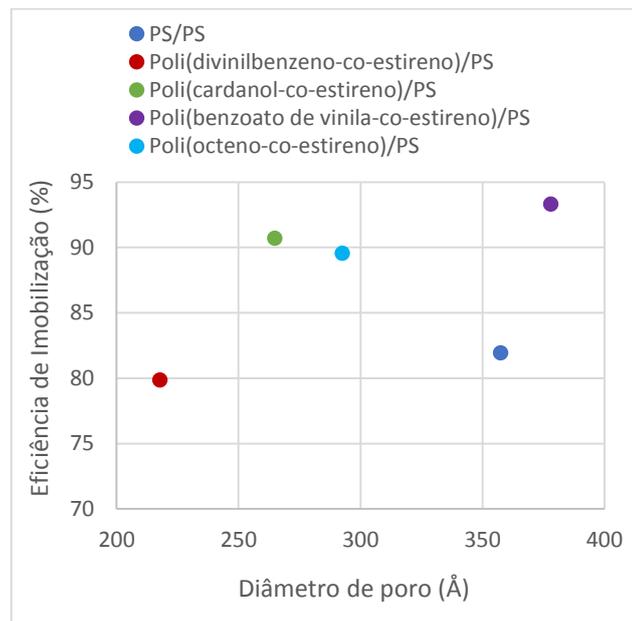


Figura 31: Relação entre eficiência de imobilização e diâmetro médio de poro.

Observa-se que, embora o suporte de PS/PS seja mais hidrofóbico que o suporte de poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS, a eficiência de imobilização no suporte de PS/PS é maior, pois ele possui um maior diâmetro médio de poro, permitindo maior difusão da solução enzimática que o suporte de poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS. Pode-se assim concluir que parece haver interação entre os três parâmetros para que seja possível determinar qual suporte vai imobilizar mais ou menos a enzima em solução (Figura 32).

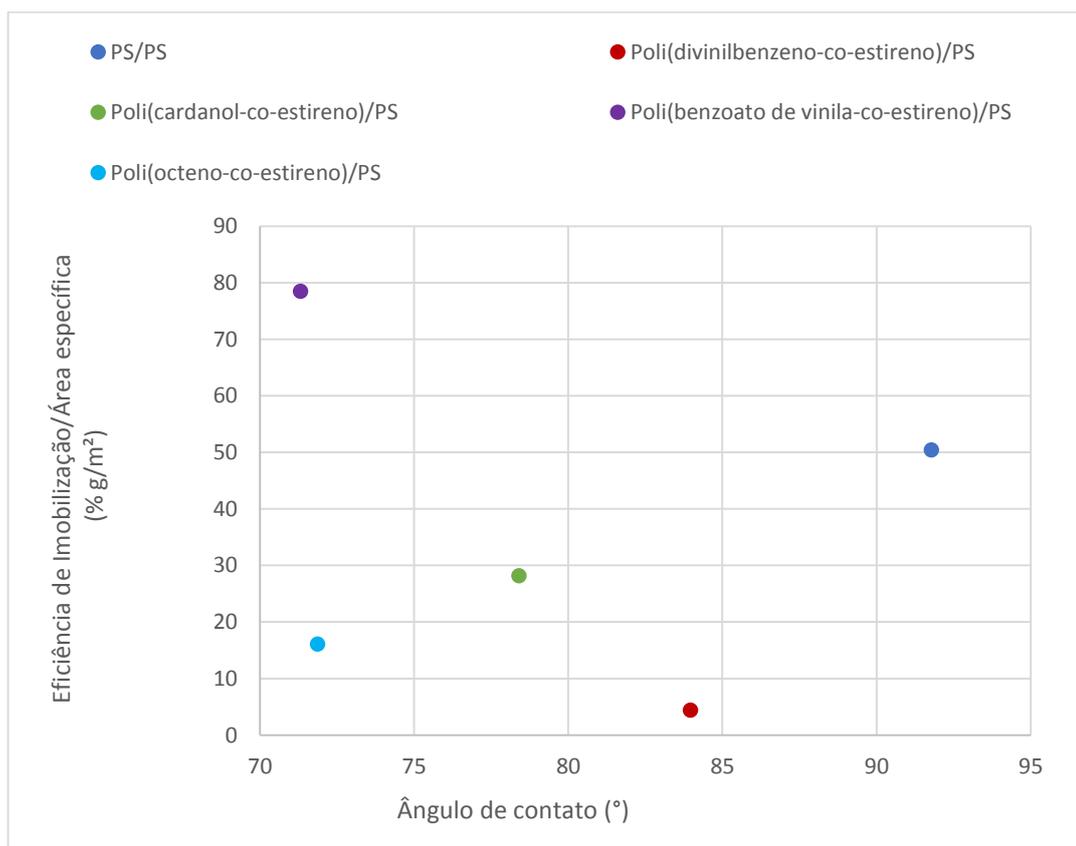


Figura 32: Interação entre eficiência de imobilização, área específica e ângulo de contato.

Após as imobilizações, o desempenho dos biocatalizadores foi avaliado quanto à capacidade de catalisar reações de hidrólise do p-nitrofenil laurato e de esterificação de ácido oleico em meio alcoólico. Na Figura 33 estão apresentados os resultados da atividade de hidrólise dos biocatalisadores.

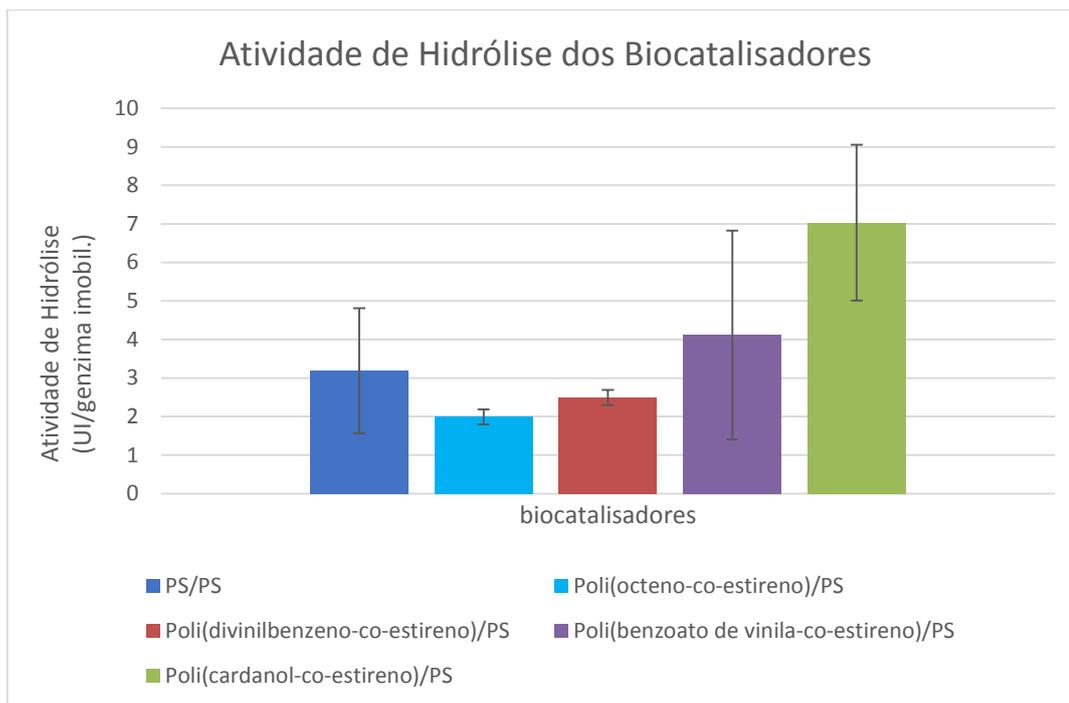


Figura 33: Atividade de hidrólise dos biocatalisadores (enzima imobilizada).

Segundo os resultados apresentados na Figura 33, todos os biocatalisadores, apresentaram baixa atividade de hidrólise, confirmando os resultados obtidos por PINTO (2013) para suportes de poliestireno. Essa baixa atividade hidrolítica é resultado das próprias características da enzima (lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) da Novozymmer que é comumente empregada para catalisar reações de esterificação. Dos biocatalisadores analisados, a enzima suportada em poli(cardanol-co-estireno)/PS, foi o que apresentou a maior atividade de hidrólise. É interessante observar que não há correlação forte entre a atividade de hidrólise e a eficiência de imobilização, mostrando que as atividades da enzima nos diferentes suportes são diferentes.

Como visto anteriormente, o suporte casca-núcleo de poli(cardanol-co-estireno)/PS é o polímero que apresenta o menor recobrimento (menor casca), quando comparado aos demais suportes. Assim, é possível admitir que nos suportes em que o recobrimento não é uniforme (núcleos mais expostos devido a uma menor casca) ocorre a minimização dos efeitos difusionais provocados pela morfologia e composição da casca porosa. Assim, nesses suportes a enzima interage com o núcleo hidrofóbico e com o copolímero da casca, deixando o centro ativo mais exposto aos substratos da reação, apresentando assim uma atividade de hidrólise mais elevada, em comparação aos suportes mais recobertos. Os suportes mais recobertos, por sua vez, parecem apresentar um maior efeito difusional.

Resultados observados por PINTO (2013) corroboram os resultados observados para os suportes sintetizados neste presente trabalho, pois PINTO (2013) notou que as enzimas imobilizadas nos núcleos de poliestireno, com áreas específicas muito baixas, apresentaram uma das maiores atividades de

hidrólise ( $\sim 5,8 \text{ UI/g}_{\text{enzima imobil.}}$ ), quando comparadas a outros suportes (porosos) com morfologia casca-núcleo de poliestireno produzidos.

Os suportes que apresentam maior grau de hidrofilicidade facilitam a difusão do meio reacional (polar) para o interior do suporte, exibindo desse modo maior atividade de hidrólise. Assim, para entender melhor a influência que os suportes desempenham sobre a atividade da enzima imobilizada, foi avaliada a relação entre a atividade e os graus de hidrofobicidade das cascas e as áreas específicas. Essas relações estão apresentadas nas Figuras 34, 35 e 36.

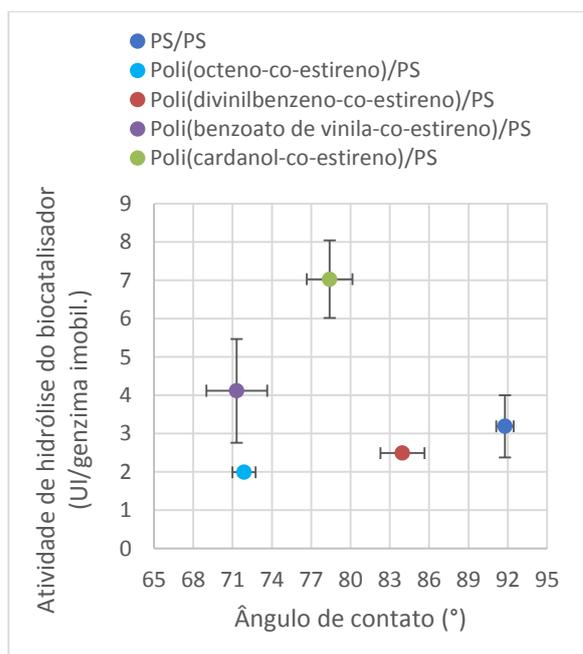


Figura 34: Relação entre atividade de hidrólise da enzima imobilizada e a hidrofobicidade dos suportes casca-núcleo.

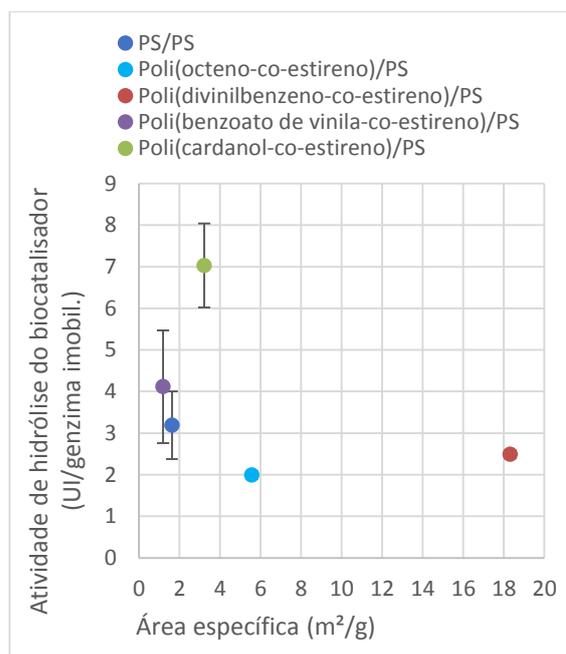


Figura 35: Relação entre atividade de hidrólise da enzima imobilizada e a área superficial específica dos suportes casca-núcleo.

De acordo com as Figuras 34 e 35, é possível observar que não é apenas o grau de hidrofobicidade da composição da casca dos suportes que influencia a atividade da enzima em catalisar reações de hidrólise. A área específica também desempenha um papel importante na atividade da enzima imobilizada, pois é possível perceber maior atividade nos suportes com um caráter mais hidrofílico e maior atividade em suportes com caráter hidrofóbico com menores áreas, como no caso do suporte de PS/PS (Figura 35). Ou seja, não há uma relação direta entre atividade de hidrólise e hidrofobicidade, assim como entre atividade de hidrólise e área específica. Logo, é uma interação entre essas três variáveis que influencia a atividade de hidrólise da enzima imobilizada (Figura 36).

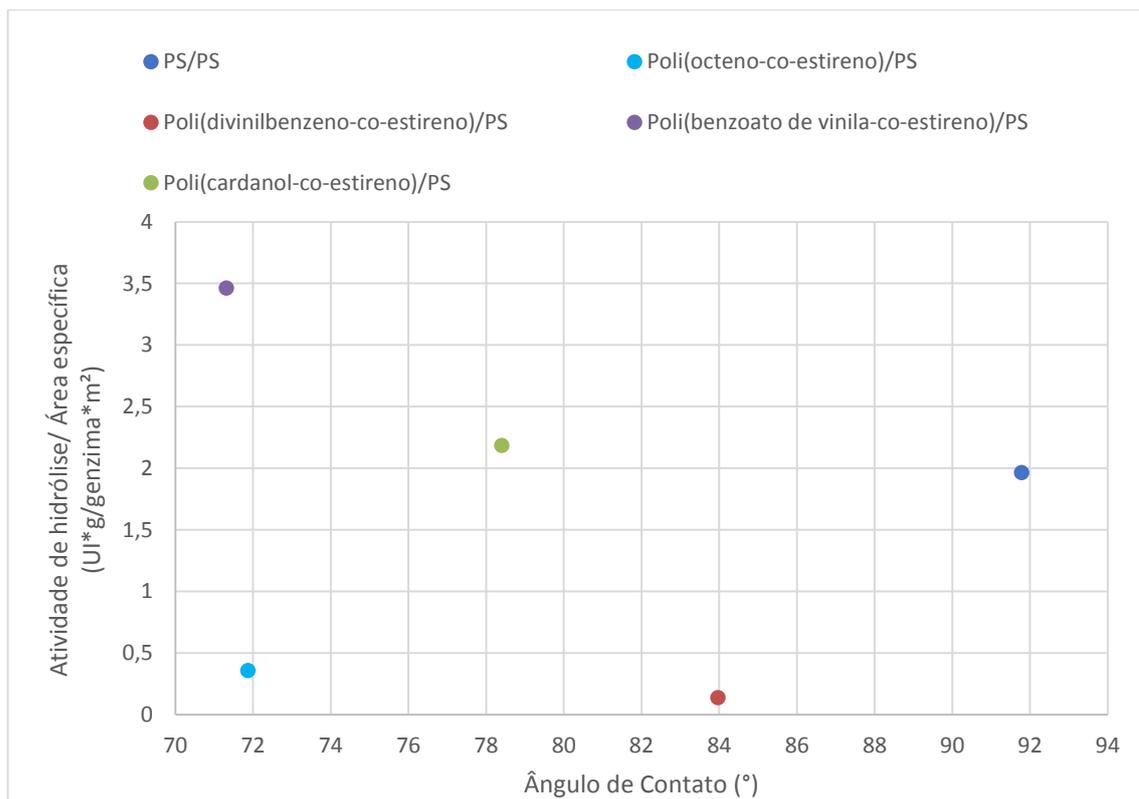


Figura 36: Relação entre área específica, ângulo de contato na atividade de hidrólise da enzima imobilizada.

Nota-se que nos suportes que possuem composição com caráter mais hidrofílico, a atividade de hidrólise da enzima imobilizada é alta, o que indica uma maior facilidade de difusão do substrato (polar) para dentro do suporte, já que muito provavelmente o centro ativo da enzima não está tão exposto quando estaria em um suporte hidrofóbico. Nesses suportes, a área específica também é menor, com diâmetro de poros maiores, o que também facilita a difusão do meio para dentro do suporte. É possível também observar que existe uma tendência no aumento da atividade de hidrólise relacionada ao aumento da hidrofobicidade dos suportes, aliado às baixas áreas específicas. Nesses ambientes os centros ativos das enzimas estão mais expostos e o meio polar consegue difundir melhor para dentro dos suportes, pois os diâmetros dos poros são maiores (área específica menor), como no caso do suporte casca-núcleo de PS/PS. Ou seja, embora seja um suporte hidrofóbico, ele exibe uma atividade de hidrólise considerável, quando comparada com as demais, pois o diâmetro dos poros minimiza os efeitos difusionais de transporte de massas.

Os biocatalisadores também foram avaliados quanto a retenção de atividade de hidrólise para sabermos o percentual de enzima que foi imobilizada e que permanece ativa, após o processo de imobilização sob os suportes. Esses valores são apresentados na Figura 37.

Os resultados são similares aos observados para a atividade de hidrólise, indicando que os biocatalisadores mais ativos são aqueles que mais retêm a atividade.

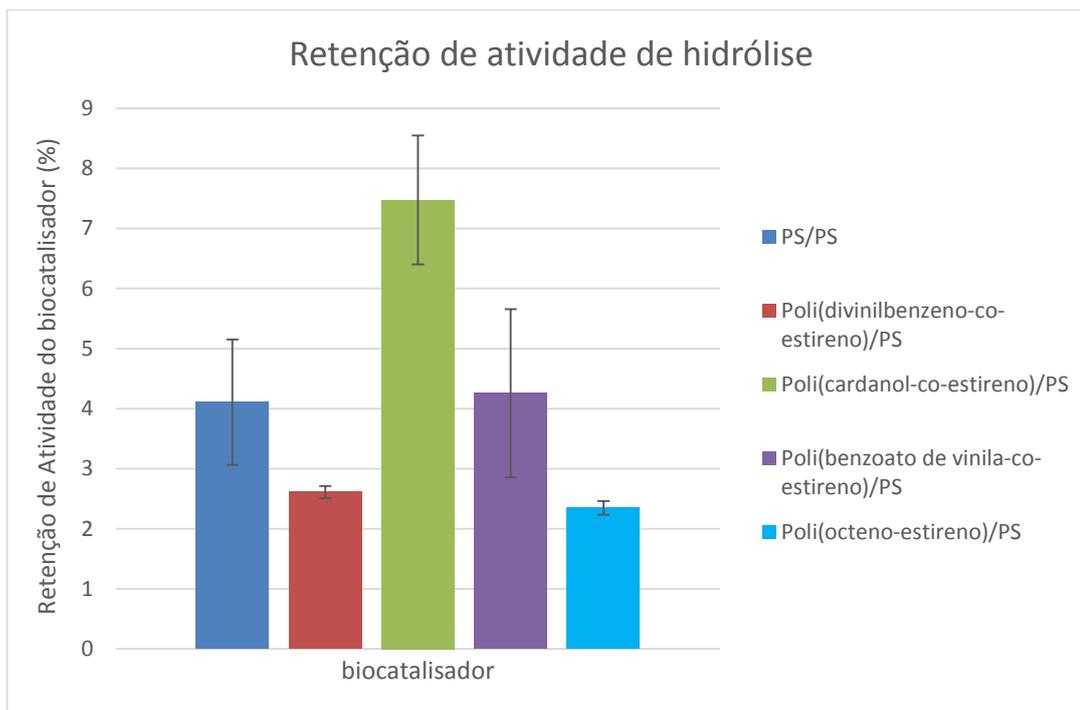


Figura 37: Retenção de atividade de hidrólise dos biocatalisadores (enzimas imobilizadas nos suportes).

Para entender a influência da interação entre os suportes e as enzimas sobre a retenção de atividade, avaliou-se a retenção de atividade como função do grau de hidrofobicidade e de área específica.

Pela análise dos gráficos nas Figuras 38, 39 e 40 é possível perceber que a retenção de atividade depende tanto da área específica do suporte quanto da polaridade de sua casca.

Outro fato que também pode ser notado é que, embora um suporte tenha resultado em maior imobilização de enzimas (maior eficiência de imobilização), não significa que ele também resultará em uma maior atividade de hidrólise e uma maior retenção de atividade, como no caso apresentado pelo biocatalisador de poli(octeno-co-estireno)/PS. Para esses casos, outros fatores devem ser levados em conta, como os efeitos difusionais; ou seja, para que um biocatalisador apresente atividade frente a uma reação, é necessário que os substratos consigam difundir do seio do meio reacional para dentro do suporte, e daí para dentro da enzima, onde irão encontrar o centro ativo e transformar substratos em produtos. Esses produtos precisam ser capazes de fazer o caminho inverso para ser possível a dosagem da atividade do biocatalisador. Caso o produto apresente alguma dificuldade ou impedimento de difundir para fora do suporte, pode ocorrer uma queda de atividade do biocatalisador, pois o centro ativo da enzima pode ficar saturado com o produto, impedindo a catálise.

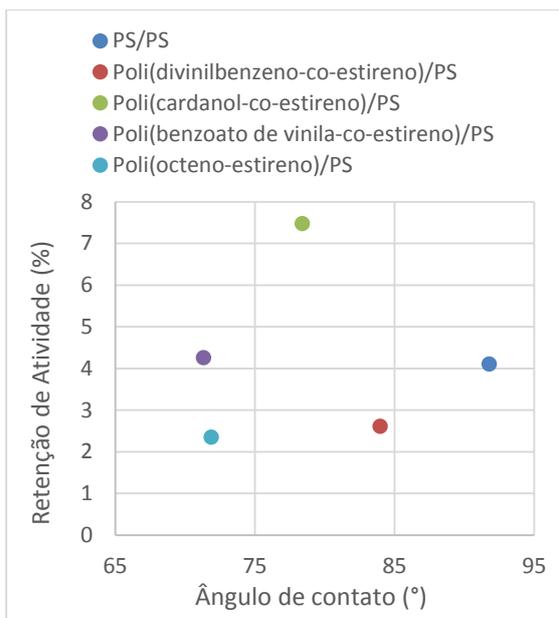


Figura 38: Relação entre retenção de atividade grau de hidrofobicidade.

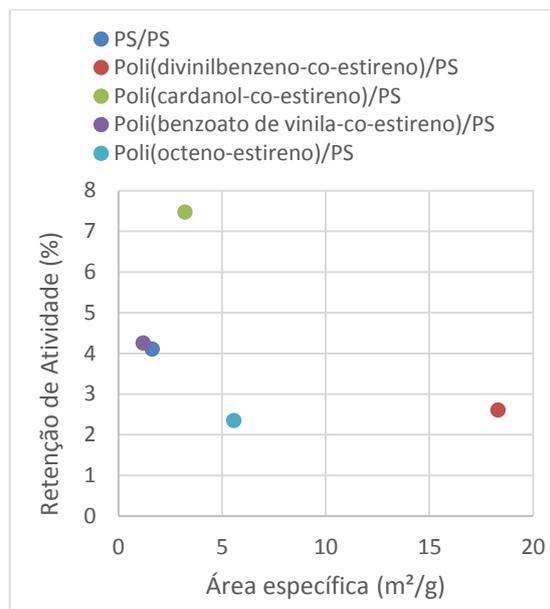


Figura 39: Relação entre retenção de atividade e área específica.

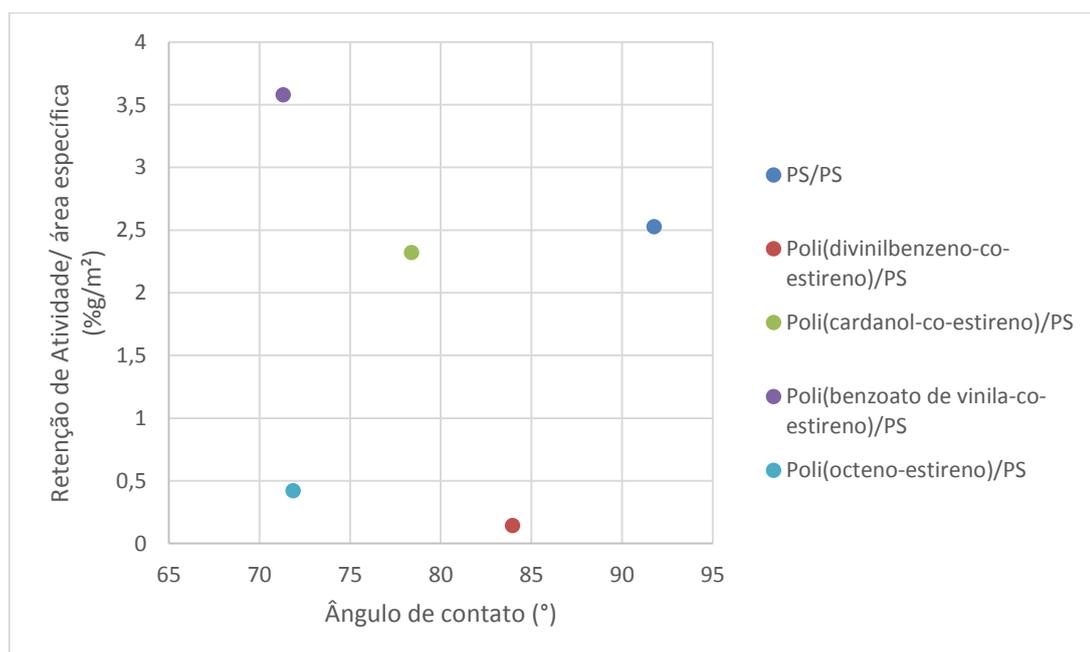


Figura 40: Influência da retenção de atividade de hidrólise com a área específica e a hidrofobicidade (polaridade) dos biocatalizador.

O desempenho dos biocatalisadores também foi avaliado quanto à atividade em promover reações de esterificação. Os resultados das atividades de esterificação para cada biocatalizador, são apresentados na Figura 41.

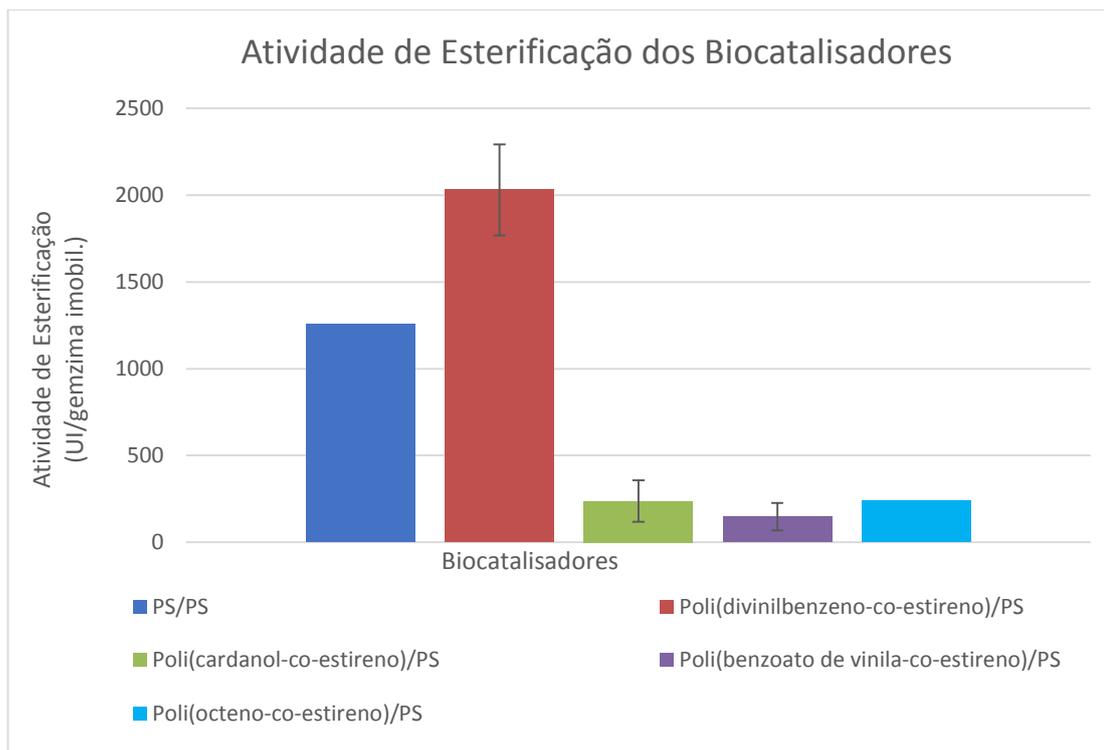


Figura 41: Atividade de esterificação dos biocatalisadores (enzima imobilizada).

A enzima imobilizada nos suportes casca-núcleo de poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS e PS/PS (casca-núcleo de poliestireno) foram os que apresentaram a maior atividade de esterificação, quando comparado aos demais biocatalisadores. De acordo com as análises de ângulo de contato, realizadas dos suportes antes da imobilização, é possível perceber que existe uma relação entre o grau de hidrofobicidade do suporte e a atividade de esterificação. Os biocatalisadores que apresentaram a maior atividade de esterificação correspondem aos suportes mais hidrofóbicos (Tabela 9).

Assim como na atividade de hidrólise, também é possível perceber a influência causada pelos efeitos difusionais nas atividades de esterificação dos biocatalisadores; contudo, esse efeito é relacionado ao decréscimo da atividade da enzima imobilizada e está presente nos suportes com caráter mais hidrofílico (Tabela 9). Nesses casos, o meio reacional (substrato), que tem caráter apolar, tem dificuldade de difundir através dos poros para o interior do suporte e do interior do suporte até o centro ativo da enzima. Quando imobilizada em superfícies hidrofílicas, a enzima apresenta menor exposição do seu centro ativo.

Novamente foi possível notar que o desempenho da enzima imobilizada, tanto na atividade de hidrólise quanto na atividade de esterificação, depende da interação entre a enzima e suporte. Essa interação está relacionada a propriedades morfológicas dos suportes produzidos, como a área superficial específica, o diâmetro médio de poro e o ângulo de contato. Desse modo, como feito para as atividades

de hidrólise, os parâmetros característicos dos suportes foram analisados, relacionando-os com as atividades de esterificação. Os resultados são apresentados nas Figuras 42, 43 e 44.

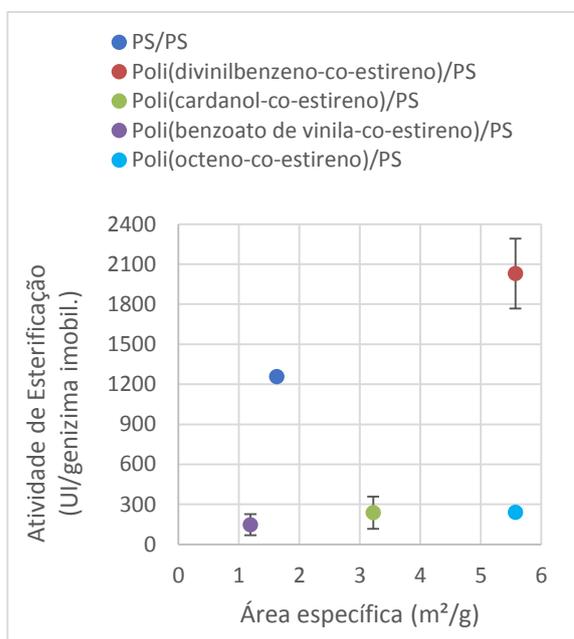


Figura 42: Relação entre atividade de esterificação e área superficial específica dos suportes casca-núcleo.

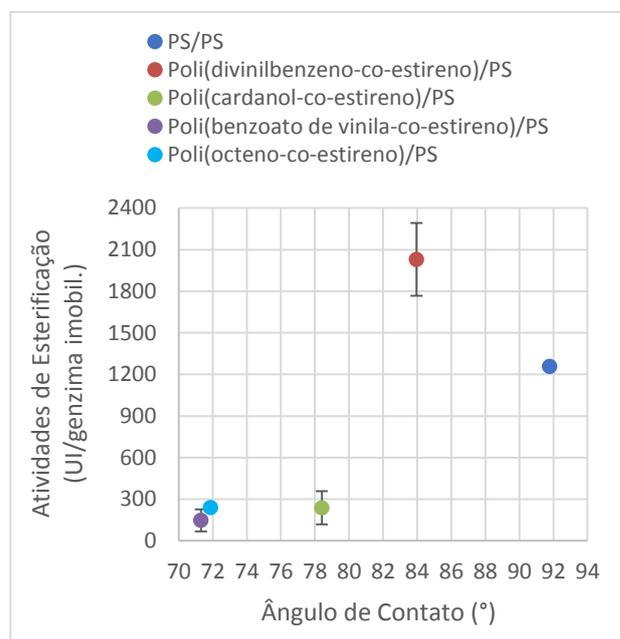


Figura 43: Relação entre atividade de esterificação e hidrofobicidade dos suportes casca-núcleo.

Observa-se que nos suportes que possuem um caráter mais hidrofílico, a atividade de esterificação da enzima imobilizada é mínima, enquanto que nos suportes que possuem uma casca mais hidrofóbica, caso dos suportes com casca de poli(divinilbenzeno-co-estireno) e de PS, a atividade de esterificação mostra-se mais elevada. Isso indica que os centros ativos das enzimas podem estar mais expostos nos suportes hidrofóbicos (Figura 43). Nas reações de esterificação a água não atua como reagente, como é o caso da reação de hidrólise, e sim como um inibidor competitivo. Deste modo, suportes mais hidrofóbicos possivelmente mantém a água mais afastada do sítio ativo aumentando a atividade de esterificação da enzima (atividade em condições aquo-restrita). Na Figura 42 não é possível observar a existência de uma relação direta entre a área específica e a atividade de esterificação.

Por meio da interação simultânea entre área específica e grau de hidrofobicidade dos suportes, é possível observar a existência de uma relação com a atividade de esterificação da enzima imobilizada. Como observado na Figura 44, suportes hidrofóbicos, quando imobilizados com a enzima, apresentaram uma maior atividade de esterificação, quando comparados a suportes mais hidrofílicos.

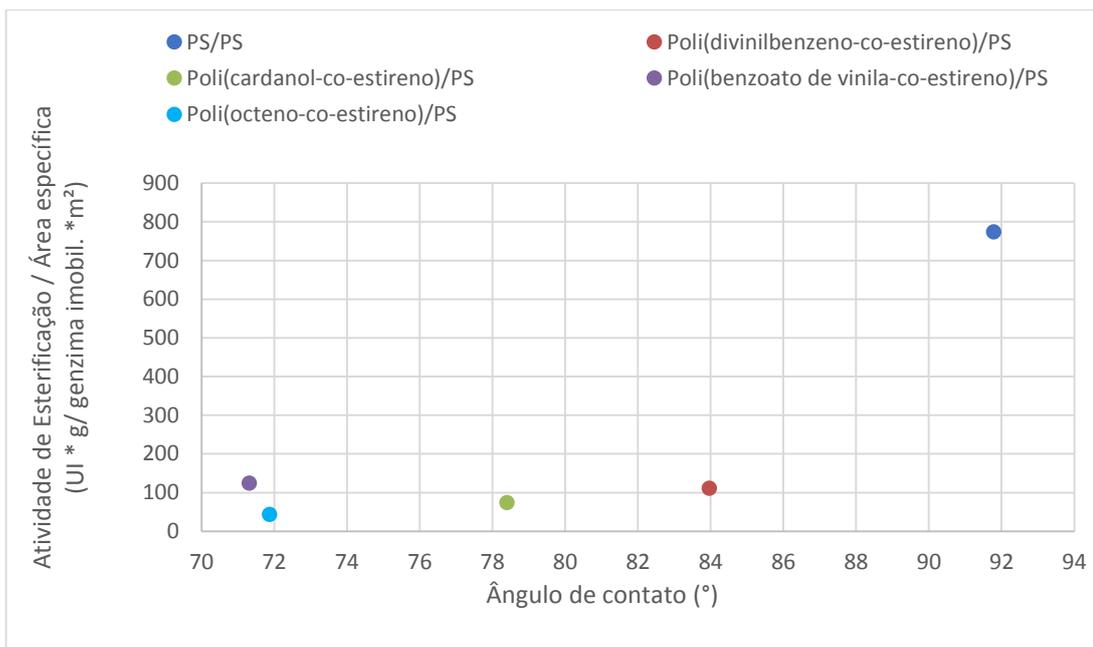


Figura 44: Relação entre atividade de esterificação por área específica e grau de hidrofobicidade dos suportes casca-núcleo.

As enzimas imobilizadas nos suportes que possuem maior caráter hidrofóbico, PS/PS e poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS, foram os suportes que imobilizaram uma menor concentração de enzimas, segundo os dados apresentados na Figura 27. Contudo, foram os suportes que apresentaram o melhor desempenho frente as reações de esterificação. Esse resultado corrobora com o fato de que as características morfológicas e de composição dos suportes estão totalmente relacionadas com o aparecimento dos efeitos difusionais, efeitos esses que são responsáveis pelas atividades apresentadas pelos biocatalisadores.

## 5. Conclusão

Foi possível produzir polímeros com morfologia casca-núcleo com diferentes estruturas por intermédio da técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão. Foi possível copolimerizar monômeros com diferentes hidrofobicidades na casca, produzindo partículas casca-núcleo com diferentes composições, que puderam ser aplicados como suportes nas imobilizações da lipase B de *Candida antarctica*.

Para determinação da composição da casca é necessária a utilização de uma técnica mais sensível e elucidativa, como a análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Foi observado que os comonômeros selecionados resultaram em materiais menos hidrofóbicos do que se imaginou. Por exemplo, o suporte polimérico que continha 1-octeno em sua composição, apresentou um carácter hidrofílico, contrapondo-se com as expectativas, pois era esperado que a copolimerização desse monômero na casca viesse a aumentar a hidrofobicidade das partículas poliméricas. Por isso, é possível que o agente emulsificante utilizado na receita da polimerização em emulsão afeta a hidroflicidade dos suportes de forma ainda pouco compreendida.

O suporte de poli(cardanol-co-estireno)/PS resultou no menor recobrimento do núcleo de PS e na menor casca. A formação da casca é função da reatividade e compatibilidade entre o material que constitui o núcleo e o material da casca. O polímero com divinilbenzeno na composição da casca apresentou a maior área específica.

Observou-se que as propriedades morfológicas dos suportes poliméricos, como área específica, diâmetro médio de poros, volume de poros e grau de hidrofobicidade, são características resultantes das diferentes composições dos polímeros que compõem a casca. Observou-se ainda que esses parâmetros influenciam de maneira distinta o desempenho cinético dos biocatalisadores (enzimas imobilizadas nos suportes) nas reações de hidrólise e de esterificação, além de influenciarem também os parâmetros de imobilização, como a eficiência de imobilização e a retenção de atividade.

Sobre o desempenho dos biocatalisadores sintetizados, foi possível notar que nas reações de esterificação, os polímeros com carácter mais hidrofóbicos apresentaram as atividades mais elevadas, como no caso dos biocatalisadores de PS/PS e os de poli(divinilbenzeno-co-estireno). Contudo nas reações de hidrólise, os biocatalisadores que possuem carácter mais hidrofílico apresentaram uma maior atividade, como o caso dos suportes de poli(cardanol-co-estireno)/PS e poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS. Essas observações estão relacionadas ao fato de que em suportes mais hidrofóbicos existe uma maior interação entre as enzimas e o suporte, o que resulta em maior exposição dos centros ativos das enzimas. Já nos suportes com maior carácter hidrofílico, os centros ativos não estão tão expostos, resultando em atividades mais baixas.

Foi possível observar que logo no início da imobilização, ocorreu a adsorção de aproximadamente 70% de enzima.

Das análises feitas em relação à interação das propriedades dos suportes (porosidade, área e polaridade) com os parâmetros de imobilização e com os resultados de atividade, foi possível concluir que o fato de um suporte resultar em uma alta eficiência de imobilização não significa que esse biocatalisador vai apresentar obrigatoriamente uma atividade alta. Esse fato foi observado nos biocatalisadores contendo casca de poli(divinilbenzeno-co-estireno) e de PS. As enzimas suportadas nesses suportes, embora não tenham imobilizado com rendimento elevado, foram biocatalisadores que apresentaram a maior atividade de esterificação.

Assim, a atividade dos biocatalisadores está relacionada à interação entre os efeitos difusionais, que levam à diminuição da atividade das enzimas imobilizadas, e entre as características das partículas poliméricas utilizadas como suportes, como o diâmetro dos poros, área específica e hidrofobicidade das partículas, juntamente com as características do meio reacional em que ocorrem as reações de catálise (se o meio é polar ou apolar).

## **5.1. Sugestões para Trabalhos Futuros**

Para trabalhos futuros, sugere-se realizar mudanças na metodologia utilizada nos processos de imobilização dos suportes, substituindo agitação magnética por um modo de agitação que não altere a morfologia casca-núcleo das partículas poliméricas. Foi observado durante as imobilizações que variações na velocidade de agitação magnética causavam a quebra de algumas partículas. Existe uma forte relação entre os parâmetros de imobilização e a estrutura morfológica e moléculas das partículas.

Novas polimerizações simultâneas devem ser realizadas aplicando monômeros com alto e baixo grau de hidrofobicidade para estudar a influência das propriedades desses suporte na imobilização enzimática.

A influência na diminuição da polaridade superficial das partículas poliméricas devido a possível presença de agente emulsificante, empregados nas reações de polimerização simultâneas em suspensão e emulsão, devem ser avaliados. Tendo em vista que é uma espécie de difícil remoção.

Finalmente, propõe-se avaliar as atividades dos biocatalisadores, obtidos nesse presente trabalho, após serem utilizados para catalisar reações de hidrólise e de esterificação. Ou seja, avaliar a estabilidade após o uso.

## Anexo A

As equações utilizadas nesse presente trabalho para calcular as conversões das reações de polimerização simultâneas em suspensão e emulsão foram elaboradas por PINTO (2013). A seguir são mostradas as etapas necessárias para calcular a conversão associada aos tempos de amostragem ao longo das reações.

Primeiramente calcula-se a massa de monômero alimentada entre os intervalos de tempo de amostragem, segundo a Equação 10.

$$\Delta m_{Mon.Alim.} = [\bar{V} \times (t_{N+1} - t_N) \times \rho]$$

Equação 10: Massa de monômero alimentada na etapa de emulsão alimentada entre cada tempo de amostragem.

onde:  $\Delta m_{Mon.Alim.}$  é a massa de monômero alimentada na etapa de emulsão alimentada entre cada tempo de amostragem;  $\bar{V}$  é a vazão média entre dois tempos de amostragem;  $t_N$  é o tempo de amostragem;  $t_{N+1}$  é o tempo de amostragem no instante seguinte;  $\rho$  é a densidade dos monômeros alimentados ( $\rho_{estireno} = 0,906 \text{ g/ml}$ ;  $\rho_{benzoato \text{ de vinila}} = 1,07 \text{ g/ml}$ ;  $\rho_{1-octeno} = 0,715 \text{ g/ml}$ ;  $\rho_{divinilbenzeno} = 0,913 \text{ g/ml}$  e  $\rho_{cardanol} = 0,9 \text{ g/ml}$ ).

Ao somar as massas de monômero alimentadas entre os tempos de amostragem, é possível determinar a massa de monômero que foi alimentada até o instante analisado Equação 11.

$$m_{Mon.total.alim(N+1)} = m_{mon.alim.(N)} + \Delta m_{Mon.Alim.}$$

Equação 11: Massa total de monômero alimentada até o instante N+1 na etapa de polimerização em emulsão alimentada.

onde:  $m_{Mon.total.alim(N+1)}$  é a massa total de monômero alimentada até o instante N+1;  $m_{mon.alim.(N)}$  é a massa de monômero alimentada até o instante N e  $\Delta m_{Mon.Alim.}$  é a massa de monômero alimentada na etapa de emulsão alimentada entre os tempos de amostragem N e N+1.

Em seguida é necessário calcular a porcentagem mássica de cada componente presente no meio reacional no tempo N+1. Para isso utiliza-se a Equação 12.

$$\% X = \frac{m_x}{m_{total(N+1)}}$$

Equação 12: Porcentagem mássica de cada componente presente no meio reacional.

onde: %  $X$  é a porcentagem mássica de cada componente presente no meio reacional no tempo  $N+1$ ;  $m_x$  é a massa de cada componente no meio reacional e  $m_{total(N+1)}$  é a massa total de reagentes presentes no reator no instante  $N+1$  e  $X$  corresponde a cada componente presente no meio reacional: iniciador da etapa de polimerização em suspensão, agente de suspensão, agente emulsificante, iniciador da etapa de polimerização em emulsão, água e bicarbonato de sódio.

Para calcular a massa total de reagentes presentes no reator no instante  $N+1$ , foi utilizada a Equação 13.

$$m_{total(N+1)} = m_{mon.alim.(N+1)} + m_{mon.susp.} + m_{ag.susp.} + m_{inic.susp.} + m_{carga\ mon.} + m_{inic.emul.} \\ + m_{emulsif.} + m_{emulsif.} + m_{bicarb.} + m_{\acute{a}gua}$$

Equação 13: Massa total de reagentes presentes no meio reacional no tempo  $N+1$ .

onde,  $m_{total(N+1)}$  é a massa total de reagentes presentes no reator no tempo  $N+1$ ;  $m_{mon.alim.(N+1)}$  é a massa de monômero alimentada até o tempo  $N+1$ ;  $m_{mon.susp.}$  é a massa de monômero adicionada na etapa de suspensão;  $m_{ag.susp.}$  é a massa de agente de suspensão adicionada;  $m_{inic.susp.}$  é a massa de iniciador adicionada na etapa de suspensão;  $m_{carga\ mon.}$  é a carga inicial de monômero adicionada na etapa de emulsão alimentada;  $m_{inic.emul.}$  é a massa de iniciador adicionado na etapa de emulsão;  $m_{emulsif.}$  é a massa de emulsificante usada na polimerização em emulsão;  $m_{bicarb.}$  é a massa de bicarbonato usada na etapa de emulsão;  $m_{\acute{a}gua}$  massa de água adicionada à reação, incluindo a quantidade utilizada no preparo das soluções aquosas.

Assim, para calcular a conversão nos intervalos analisados (N+1), foi utilizado a Equação 14.

$$C_{n+1} = \frac{m_{seca} - m_{hidroq.} - (m_{úmida} \times \% Ag.susp.) - (m_{úmida} \times \% Bicarb.) - (m_{úmida} \times \% I_{emuls.}) - (m_{úmida} \times \% I_{susp.}) - (m_{úmida} \times \% Emulsif.)}{(1 - \% I_{susp.} - \% Bicarb. - \% Ag.susp. - \% Água - \% I_{emuls.} - \% Emulsif.) \times m_{úmida}}$$

Equação 14: Cálculo de conversão para cada intervalo de tempo analisado.

onde,  $m_{seca}$  é a massa da amostra seca depois de estabilizada, desconsiderando a massa da cápsula;  $m_{hidroq.}$  é a massa de hidroquinona presente na solução aquosa de hidroquinona 1%(p/v);  $m_{úmida}$  é a massa da amostra após retirada do reator e  $C_{n+1}$  é a conversão em cada instante de tempo analisada.

## Anexo B

Nas figuras a seguir são apresentadas curvas cinéticas das reações de copolimerização em massa do monômero estireno com os comonômeros 1-octeno, benzoato de vinila, cardanol e divinilbenzeno. Também são apresentadas as curvas de distribuição de massas molares correspondentes às reações de polimerização em massa. O percentual dos comonômeros nas receitas são de 1% e 5% em massa.

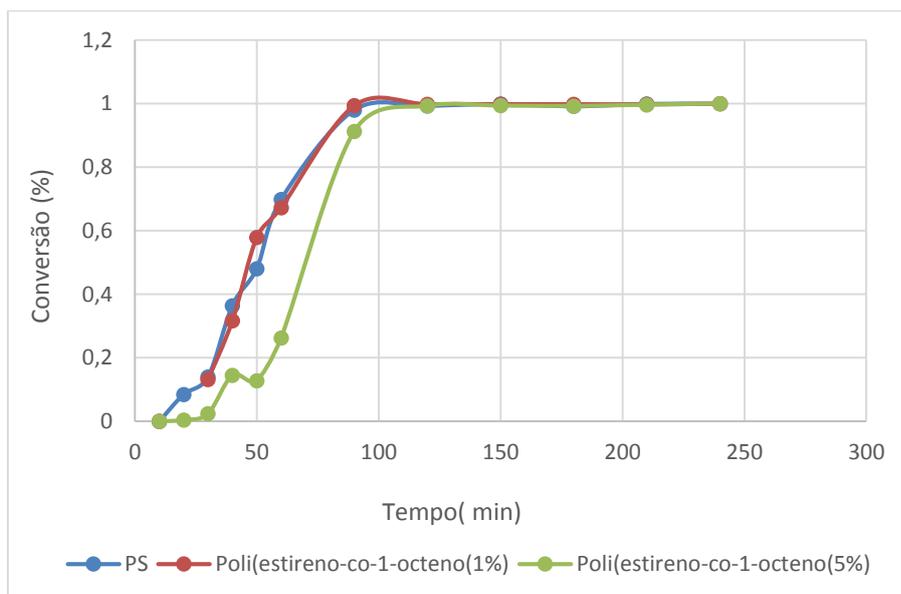


Figura 45: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-octeno) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero 1-octeno de: 1%, 5% em massa.

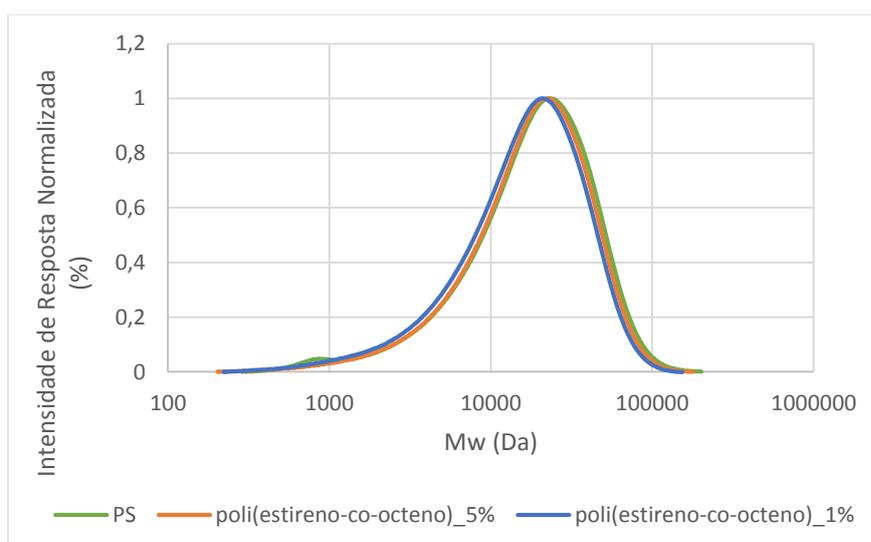


Figura 46: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de 1-octeno.

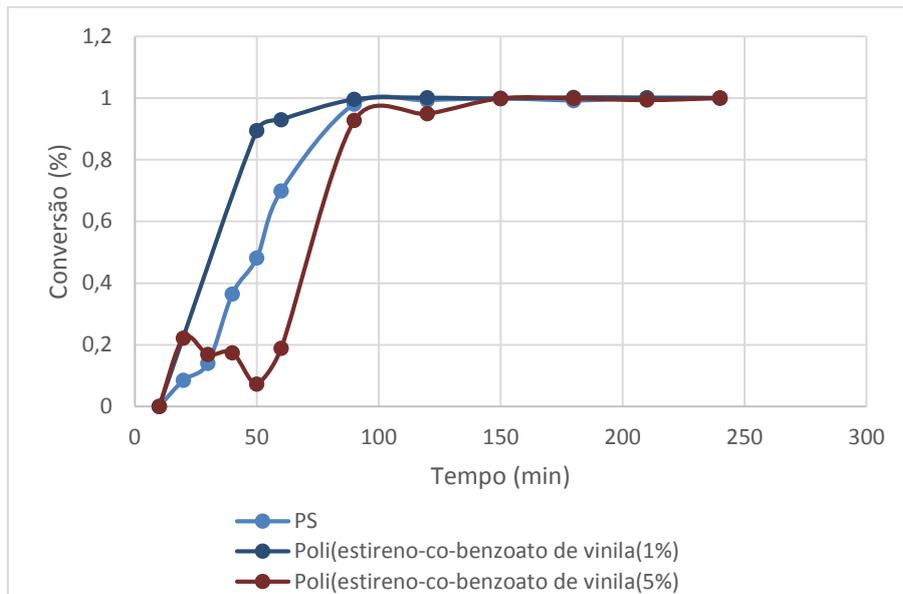


Figura 47: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-benzoato de vinila) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero benzoato de vinila de: 1% e 5% em massa.

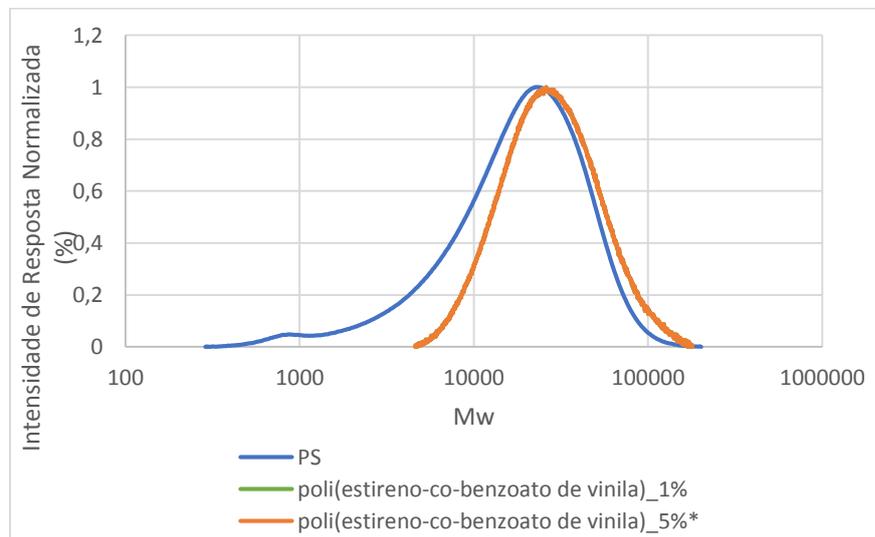


Figura 48: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de benzoato de vinila.

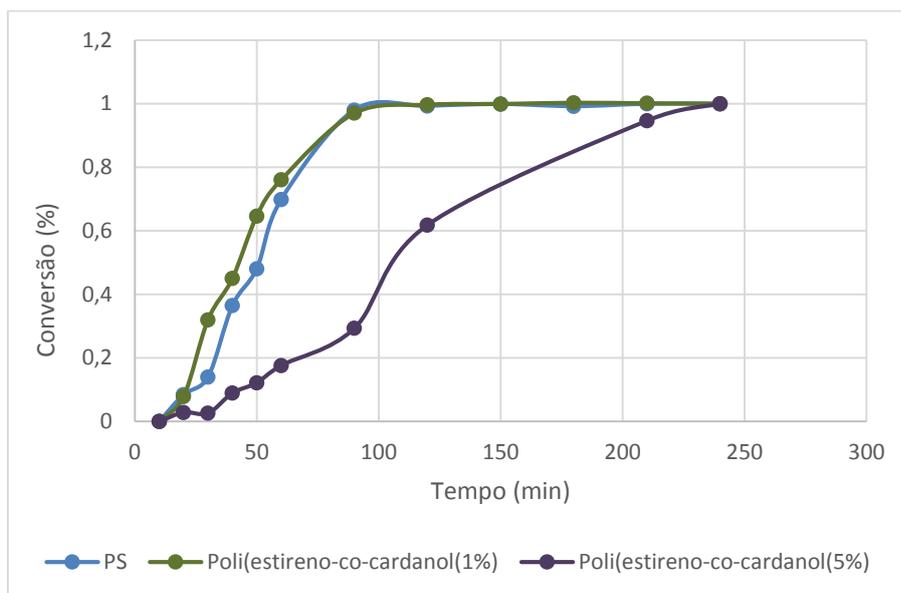


Figura 49: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-cardanol) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero cardanol de: 1% e 5% em massa.

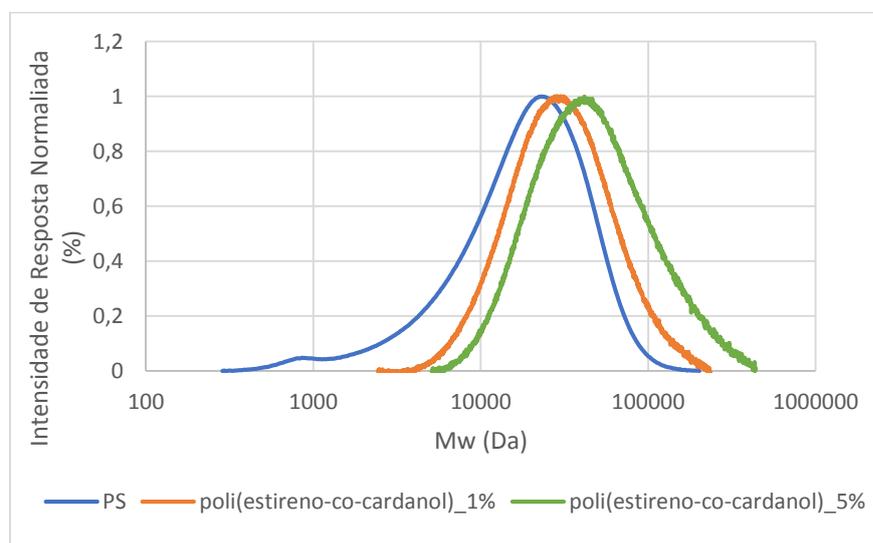


Figura 50: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de cardanol.

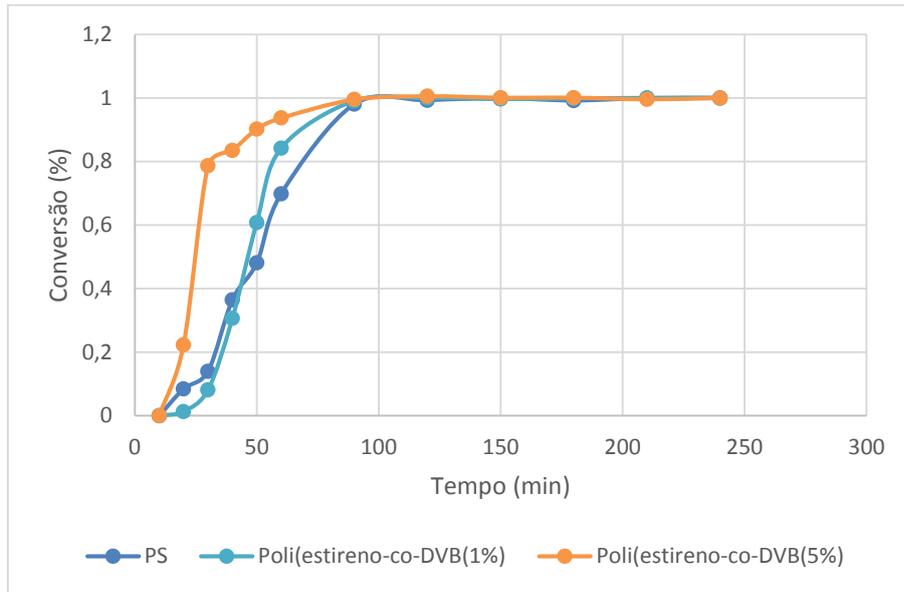


Figura 51: Cinética da polimerização em massa do poli(estireno-co-divinilbenzeno) comparadas com a cinética de polimerização em massa do poliestireno (PS). Concentrações do monômero divinilbenzeno (DVB) de: 1% e 5% em massa.

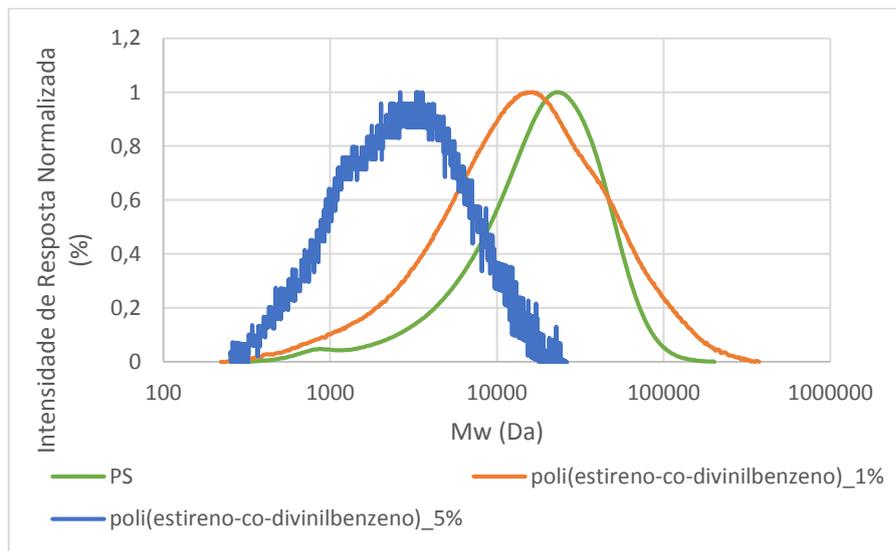


Figura 52: Curvas de distribuição de massas molares das copolimerizações em massa de estireno com 1% e 5% de divinilbenzeno.

## Anexo C

A seguir são apresentadas as curvas de distribuição de tamanhos de partículas dos sobrenadantes das reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão.

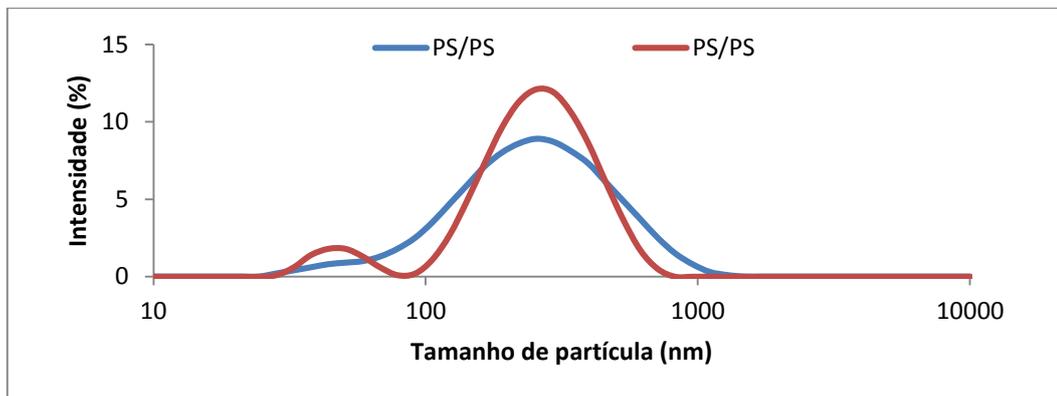


Figura 53: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de PS/PS. Análise realizada em duplicata.

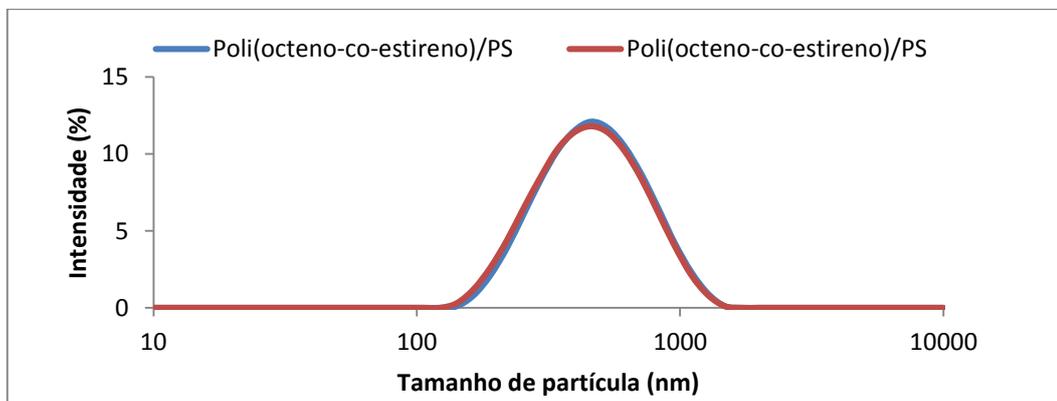


Figura 54: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(octeno-co-estireno)/PS. Análise realizada em duplicata.

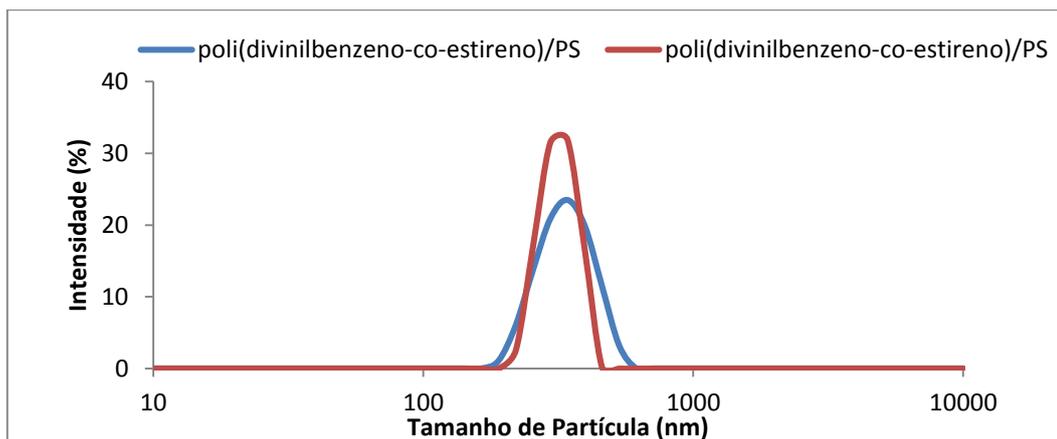


Figura 55: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(divinilbenzeno-co-estireno)/PS. Análise realizada em duplicata.

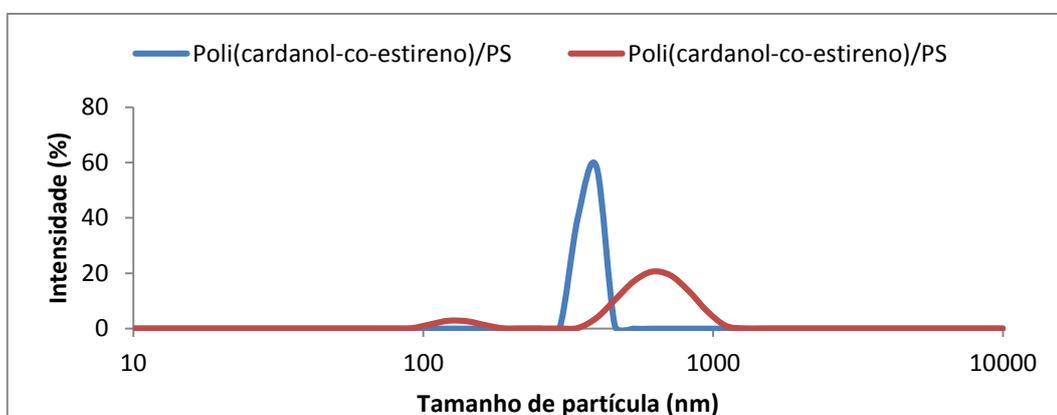


Figura 56: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(cardanol-co-estireno)/PS (fase do topo). Análise realizada em duplicata.

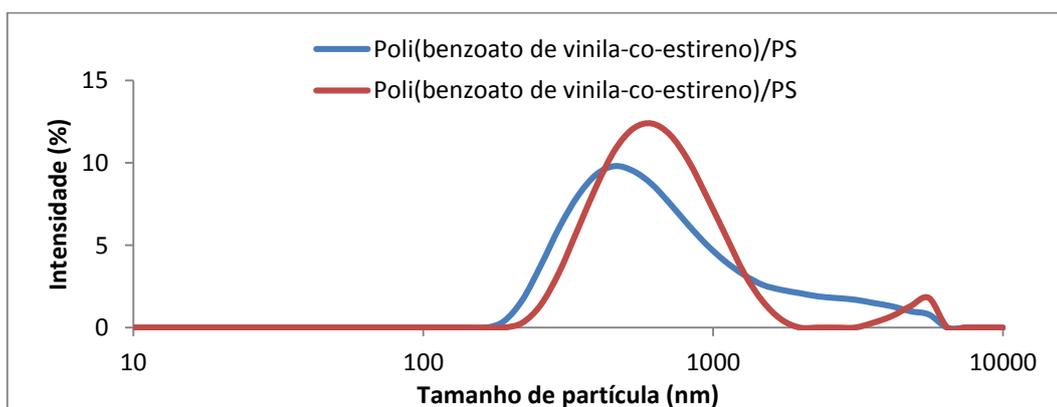


Figura 57: Distribuição de tamanhos de partículas do sobrenadante da reação de poli(benzoato de vinila-co-estireno)/PS. Análise realizada em duplicata.

## Anexo D

São apresentados os espectros de FTIR das amostras dos polímeros casca-núcleo.

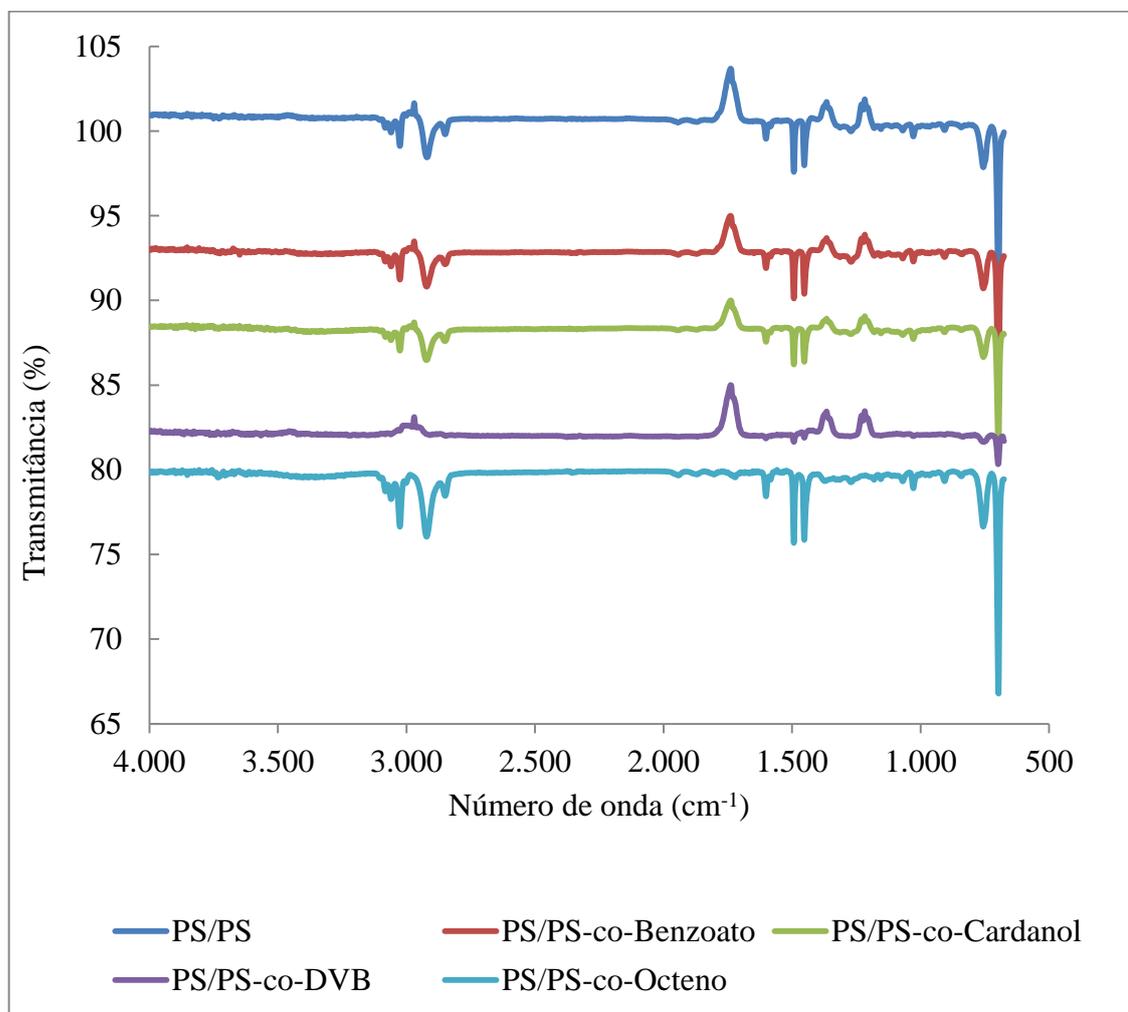


Figura 58: Espectros de FTIR das partículas poliméricas usadas nas imobilizações da CAL-B.

## Anexo E

Curva de padrão de albumida de soro bovino (BSA) realizada no UV-vís no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm utilizada nos ensaios de cinética de imobilização baseada na dosagem de proteína.

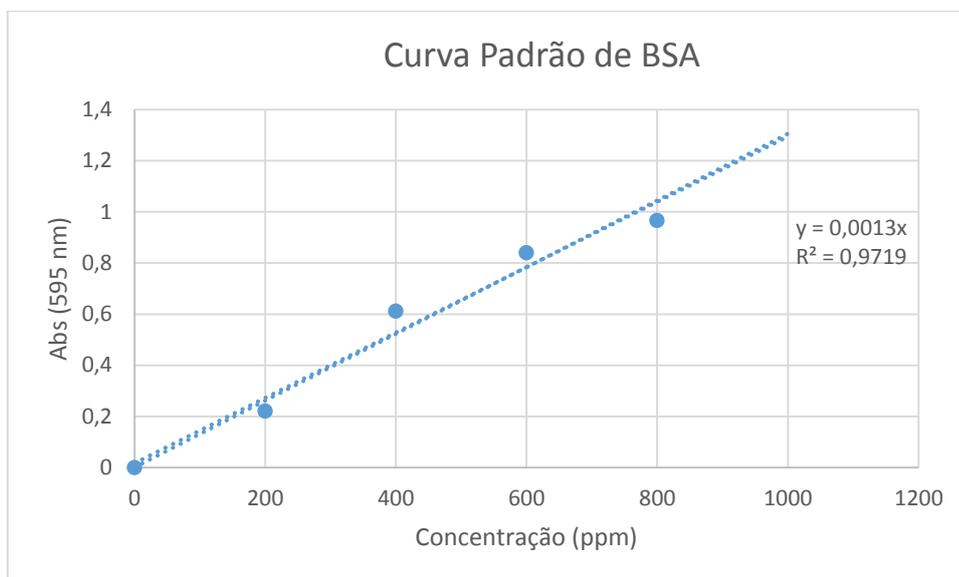


Figura 59: Curva padrão no UV-vís de BSA, utilizada para dosagem de proteína presente nos sobrenadantes colhidos durante as imobilizações.

## 6. Bibliografia

- AL-ZUHAIR, S., ALMENHALI, A., HAMAD, I., *et al.*, 2011. *Renew Energy*, v. 36, pp. 2605.
- BESTETI, M. D., 2009, *Produção e Caracterização de Partículas Casca-núcleo Obtidas pela Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BESTETI, M. D., 2011, *Produção de Partículas Poliméricas com Porosidade Controlada para a Preparação de Biocatalisadores*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BRAUN, H. C., 2005. *Polymer Synthesis: Theory and Practice. Fundamentals, Methods, Experiments*. 4<sup>a</sup> ed. Berlim, Springer.
- BRÍGIDA, A. I. S., 2010, *Imobilização de Lipases Utilizando Fibra da Casca de Coco Verde como Suportes para Aplicação Industrial*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- CANEVAROLO S. V. JR., 2002. *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo, Artliber Editora.
- CASTRO, H. F., ZANIN, G. M., MORAES, F. F., *et al.*, 2008. “Imobilização de Enzimas e sua Estabilização”. In: Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L., *et al.*, (eds), *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado*, 1<sup>a</sup> ed., capítulo 06, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência.
- CHEN, H., CHEN, G. Q., 2011, “ Energy cost of rapeseed biodiesel as alternative energy n China”, *Renew Energy*, v. 36, pp. 1374 - 1378 .
- CUNHA, A. G., BESTETI, M. B., MANOEL, E. M., *et al.*, 2014. “Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida Antarctica*”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 100, pp. 59 – 67.
- DEDAVID, B. A., GOMES, C. I., MACHADO, G., 2007. *Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre, Brasil, EDIPUCRS.
- DELLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M. d., SOLDI, V., 2004. “Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros”. *Química Nova*, v.27, no.4, pp. 623 - 630.
- FABER, K., 1997. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3<sup>a</sup> ed. Berlin, Springer.

- FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ARMISÉN, P., SABUQUILLO, P., *et al.*, 1998, “Imobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports”, *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, pp. 185 – 197.
- FREIRE, D. M. G., 1988, *Imobilização da Amiloglicosidade em Quitina - Caracterização e Testes em Reatores Contínuos de Leito Expandido*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FREIRE, D. M. G., 1996. *Seleção de Microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por Penicillium restrictum*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FREIRE, D. M., CASTILHO, L. R., 2008. “Lipases em Biocatálise”. In: Bom, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L., *et al.* (eds), *Enzimas em Biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado*, 1ª ed., pp. 367-383. Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência.
- KIPARISSIDES, C., 1996. “Polymerization Reactor Modeling: A Review of Recent Developments and Future Directions”, *Chemical Engineering Science*, v. 51, pp. 1637-1659.
- LENZI, M. K., 2002, *Modelagem da Polimerização Simultânea de Estireno em Suspensão e Emulsão*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- LENZI, M. K., SILVA, F. M., LIMA, E. L., *et al.*, 2003, “Semibatch Styrene Suspension Polymerization Processes”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 89, pp. 3021-3038.
- LUZ, A. P., RIBEIRO, S., PANDOLFELLI, V. C., 2008. “Artigo revisão: Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários”, *Cerâmica*, v. 54, pp.174-183.
- MACHADP, F., LIMA, E. L., PINTO, J. C. (23 de Março de 2007). Uma Revisão Sobre Processos de Polimerização em Suspensão. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 17, pp. 166-179.
- MALVERN PRODUCTS: particle size: Mastersizer 2000. Site da Malvern Instruments. Disponível em: <http://www.malvern.com/LabEng/products/Mastersizer/MS2000/mastersizer2000.htm?gclid=CNPd-OTq9LoCFTRk7AodpmAAMQ>. Acesso em: 21 de Novembro de 2013.
- MALVERN PRODUCTS: particle size: Zetasizer Nano ZS. Site da Malvern Instruments. Disponível em: [http://www.malvern.com/labeng/products/zetasizer/zetasizer\\_nano/zetasizer\\_nano\\_zs.htm](http://www.malvern.com/labeng/products/zetasizer/zetasizer_nano/zetasizer_nano_zs.htm). Acesso em: 21 de Novembro de 2013.
- MANO, E. B., MENDES, L. C., 1999. *Introdução a Polímeros*. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Editora Edgard Blucher LTDA.

- MOJOVIC, L., KNEZEVIC, Z., POPADIC, R., *et al.*, 1998, “ Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support”, *Applied Microbiol Biotechnology*, v. 50, pp. 676-681.
- NETO, J., *Termogravimetria*. Wikipédia, a enciclopédia livre. Disponível em : <http://pt.wikipedia.org/wiki/Termogravimetria>. Acesso em: 12 de Novembro de 2013.
- ODIAN, G., 2004, *Principles of Polymerization*. 4ª ed. New Jersey, USA, John Wiley & Sons.
- PINTO, J. C., ALVEZ, T. L. M., LIMA, E. L., *et al.*, 2004a, “ Processo de Preparação de Resina Polimérica com Distribuição Bimodal de Pesos Molares e/ou com Estrutura Casca-Núcleo e seu Uso”, *Patente N° PI040080 3-0*.
- PINTO, M. (2013). *Influência de Variáveis Operacionais na Morfologia de Suportes Enzimáticos Preparados por Polimerização em Suspensão-Emulsão*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, Rj, Brasil.
- RAMIREZ, J. C., HERRERA-ORDONEZ, J., MALDONADO-TEXTLE, H., 2005, “Kinetic of the styrene emulsion polymerization above cmc. II. Agitation effect on molecular weight”, *Polymer Bulletin*, v. 53, pp. 333 - 337.
- SALIS, A., SANJUST, E., SOLINAS, V., *et al.*, 2003, “Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 24 – 25, pp. 75-82.
- SMITH, W. V., EWART, R. H., 1948, “Kinetics of emulsion polymerization”. *Journal of chemical physics*, v. 16, pp. 592 – 599.
- SANTANA, M. F. S., KATEKAWA, M. E., TANNOUS, K., *et al.*, 2012, “Área Superficial e Porosidade da Fibra Alimentar do Albedo de Laranja”, *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 14, n.3, pp. 261-273.
- STRAATHOF, J., PANKE, S., SCHMID, A., 2002, “ The production of fine chemicals by biotransformations”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 548 - 556.
- TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S., 2001, “ Principais Métodos de Caracterização de Porosidades de Resinas à Base de Divinilbenzeno”, *Química Nova*, v. 24, pp. 808 - 818.
- UPPENBERG, J., HANSEN, M. T., PATKAR, S., *et al.*, 1994, “The sequence, crystal, structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*”, *Structure*, v. 2, pp. 293 - 308.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J., *et al.*, 2000, “Customizing lipases for biocatalysis A survey of chemical, physical and molecular biological approaches”, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, v. 9, pp. 113 - 148.

